SULFITBILDUNG DURCH WEINHEFEN DER GATTUNG SACCHAROMYCES: UNTERSUCHUNGEN ZUM SULFIT-TRANSPORT

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
EVA-BEATE JORZIG
aus
JENA

BONN 1985

SULFITBILDUNG DURCH WEINHEFEN DER GATTUNG SACCHAROMYCES: UNTERSUCHUNGEN ZUM SULFIT-TRANSPORT

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

EVA-BEATE JORZIG

aus

JENA

BONN 1985

Diese Arbeit wurde mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
am Institut für Mikrobiologie durchgeführt;
Direktor: Prof. Dr. H.G. Trüper.

Referent: Prof. Dr. H.G. Trüper
Korreferent: Prof. Dr. J. Krämer

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.1985

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546503_0014

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	11
1.1	Sulfitbildung durch Hefen	11
1.2	Sulfit als Zellgift	13
1.3	Sulfit- und Sulfat-Transport	19
1.4	Ziele der Arbeit	24
2.	Material und Methoden	27
2.1	Organismen	27
2.2	Nährmedien	27
2.2.1	Komplexer Nähragar	27
2.2.2	Synthetische Nährlösung	28
2.3	Stammhaltung	29
2.4	Zellanzucht	29
2.4.1	Vorkulturen	29
2.4.2	Anaerobe Anzucht	30
2.4.3	Aerobe Anzucht	30
2.4.4	Zellanzucht mit radioaktiv markiertem Sulfat	30
2.5	Messung des Wachstums	31
2.5.1	Trockengewichtsbestimmung	31
2.5.2	Proteinbestimmung an ganzen Zellen nach SCHMIDT et al. (1963)	31
2.6	Analyse und chromatographische Trennung von Schwefelverbindungen	32
2.6.1	Sulfitbestimmung nach GRANT (1947)	32
2.6.2	Sulfitbestimmung nach WEST und GAEKE (1957)	33
2.6.3	Präparative Trennung von Sulfat und Sulfit auf Dowex-Ionenaustauscher nach IGUCHI (1958 a, b) und TRUDINGER (1964)	34
2.6.4	Sulfitbestimmung nach PAUL (1958)	34
2.6.4.1	Gesamtsulfit	34
2.6.4.2	Bestimmung des freien und des gebundenen Sulfits	35
2.6.4.3	Sulfitbestimmung nach PAUL (1958), modifiziert	36

Seite

2.6.5 Bestimmung von radioaktiv markiertem Sulfit 36

2.6.6 Enzymatische Sulfitbestimmung nach BEUTLER und SCHÜTTE (1983) 37

2.6.7 Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Nukleotiden, Sulfat und Sulfit 38

2.6.8 Analytische Hochspannungselektrophorese 39

2.6.9 Sulfatbestimmung 39

2.6.9.1 Sulfatbestimmung nach DODGSON (1961) 39

2.6.9.2 Nachweis von Sulfat auf Dünnschichtchromatographieplatten 40

2.7 Transportuntersuchungen 41

2.7.1 Sulfataufnahme 41

2.7.2 Messung des Sulfit-Efflux durch Bestimmung der Sulfitkonzentration im Überstand 43

2.7.2.1 Einsatz von kaltem Sulfat 43

2.7.2.2 Einsatz von radioaktiv markiertem Sulfat 44

2.7.3 Messung des Sulfit-Efflux durch Bestimmung der intrazellulären Radioaktivität 45

2.8 Untersuchungen mit Transportinhibitoren 45

2.9 Bestimmung der intrazellulären Sulfitkonzentration 46

2.9.1 Zentrifugation in ein spezifisch dichteres Medium 46

2.9.2 Permeabilisierung der Zellen mit Nystatin 46

2.9.2.1 Vergleich der durch Kochen bzw. durch Zugabe von 0.1 mM Nystatin extrahierten Phosphatmenge 46

2.9.2.2 Permeabilisierung der Zellen durch Nystatin zur Bestimmung der intrazellulären Sulfitkonzentration 47

2.10 Radioaktive Markierung der intrazellulären Schwefelverbindungen 48

2.10.1 Einsatz einer radioaktiven Schwefelquelle 48

Seite

2.10.2 Extraktion der intrazellulären Verbindungen 48

2.10.3 Fraktionierung und Chromatographie der radioaktiven Extrakte 49

2.11 Spektrometrische Bestimmung der Natrium- und Kalium-Ionen 49

2.12 Phosphat-Bestimmung nach TAUSSKY und SHORR (1953) 50

2.13 Radioaktivitätsmessung 51

2.13.1 Flüssigkeitsszintillationszähler 51

2.13.2 Messung der Radioaktivität auf Chromatographieplatten und Elektrophoresepapier 51

2.14 Entfernen von Sauerstoff aus Gasen durch einen Kupferkatalysator 52

2.15 Herkunft der Chemikalien 52

3. Experimente und Ergebnisse 53

3.1 Wird Sulfit über den Sulfat-Träger transportiert? 53

3.1.1 Charakterisierung des Sulfat-Transportsystems 53

3.1.1.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Sulfataufnahme 53

3.1.1.2 Abhängigkeit von der Inkubationsdauer ohne Schwefelquelle 55

3.1.1.3 Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Inkubationsmediums 56

3.1.1.4 Einfluß des extrazellulären pH-Wertes 60

3.1.2 Einfluß des Analogons Sulfit auf die Sulfataufnahme 61

3.1.2.1 Hemmung durch steigende Sulfitkonzentrationen 62

3.1.2.2 Präinkubation mit Sulfit 63

3.1.2.3 Einfluß der verschiedenen molekularen Formen des Sulfits auf die Sulfataufnahme 64

3.1.2.4 Analyse des Hemmtyps 68

3.2 Sulfit-Efflux 71

3.2.1 Orientierende Vorversuche und Optimierung der Versuchsdurchführung 71

Seite

	3.2.1.1	Wachstum der Hefen mit Sulfit als einziger Schwefelquelle	71
	3.2.1.2	Sulfit-Efflux nach Wachstum der Zellen mit Sulfat	73
	3.2.1.3	Sulfit-Efflux in Abhängigkeit von der Wachstumsphase	74
	3.2.1.4	Ermittlung geeigneter Bestimmungsmethoden für die Messung des Sulfit-Efflux	75
3.2.2		Einfluß von Substratanaloga und anderen Anionen	77
3.2.3		Einfluß von Methionin und Cystein	81
3.2.4		Energieabhängigkeit des Transports	83
3.2.5		Ist der Transport oder der Stoffwechsel geschwindigkeitsbestimmend?	90
3.2.6		Hemmung des Efflux durch extrazelluläres Sulfit	91
	3.2.6.1	Abhängigkeit von der Sulfit-Konzentration	91
	3.2.6.2	Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration	92
	3.2.6.3	Efflux von Sulfit bei konstanter SO_2 - Konzentration im Inkubationspuffer	93
3.2.7		Ist einfache Diffusion oder ein katalysierter Transport für den Sulfit-Efflux verantwortlich?	95
	3.2.7.1	Orientierende Vorversuche zur Bestimmung der intrazellulären Sulfitkonzentration	96
	3.2.7.2	Aufschluß der Zellen mit Nystatin	99
	3.2.7.3	Zentrifugation in ein spezifisch dichteres Medium	102
	3.2.7.4	Vergleich der intra- und der extrazellulären Sulfit-Konzentration	102
3.2.8		Ladungskompensation	104
	3.2.8.1	Protonen	104
	3.2.8.2	Anionen	106
	3.2.8.3	Natrium- und Kaliumionen	107
	3.2.8.4	Handelt es sich um einen Kalium/Sulfit-Symport?	110
3.2.9		Welche intrazelluläre Verbindung ist für den Sulfit-Efflux verantwortlich?	111
	3.2.9.1	Qualitative Analyse der intrazellulären Schwefelverbindungen	112

Seite

3.2.9.2 Quantitative Analyse der intrazellulären Schwefelverbindungen 113

3.2.9.3 Vergleich zwischen intrazellulärer Sulfatkonzentration und der Menge des ausgeschiedenen Sulfits 116

4. Diskussion 118

4.1 Einfluß von Sulfit auf die Sulfataufnahme 119

4.2 Sulfit-Efflux 130

5. Zusammenfassung 150

6. Literaturverzeichnis 152

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	5'-Adenosinphosphosulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosion-5'-triphosphat
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
Ci	Curie
cpm	counts per minute
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DES	Diethylstilböstrol
DNP	Dinitrophenol
IAA	Jodacetamid
K_T	Halbsättigungskonstante
NAD(H)	oxid. (red.) Nicotinamid-adenin-dinucleotid
n.b.	nicht bestimmt
OAHS	O-Acetylhomoserin
OAS	O-Acetylserin
OD	optische Dichte
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
R_f	Retention factor
RSA	Rinderserumalbumin
S	Substratkonzentration
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
$(^{35}SO_4^{=})i$	intrazelluläres, radioaktiv markiertes Sulfat
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	3,3',4',5-Tetrachlorsalicylanilid
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V_T	Maximalgeschwindigkeit
v	velocity, Reaktionsgeschwindigkeit

1. Einleitung

1.1 Sulfitbildung durch Hefen

In vino veritas - das ist allgemein bekannt. Weniger bekannt dagegen ist, daß Wein auch Sulfit enthält, und zwar häufig mehr, als es der Gesetzgeber erlaubt (EG-Verordnung Nr. 1679/77).
Der schwefligen Säure kommt bei der Weinbereitung eine große Bedeutung zu. Sie wird Maische, Most oder Wein zugesetzt, um die Haltbarkeit sowie die geschmackliche und farbliche Qualität der Weine zu verbessern (CHICHESTER und TANNER, 1972; DITTRICH, 1977; VOGT, 1984).

Die zelltoxischen Eigenschaften dieser Verbindung (vgl. 1.2) führten zu häufigen Analysen des Weins. Dabei stellte man fest, daß oft mehr Sulfit nachzuweisen war, als man ursprünglich zugesetzt hatte (VOGT, 1970).
Nach anfänglichen Fehlschlüssen über die Herkunft dieses Sulfits (ZANG, 1963) bestätigte sich die von HAAS (1889) geäußerte Vermutung einer biologischen Sulfitbildung durch die Weinhefen. Zahlreiche Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zur Klärung dieses Phänomens führten zu dem Ergebnis, daß die Ursache in einer Störung des assimilatorischen Schwefelstoffwechsels der sulfitbildenden Weinhefen zu suchen ist (WÜRDIG und SCHLOTTER, 1970; DITTRICH und STAUDENMAYER, 1970; BONISCH und ESCHENBRUCH, 1976; ROMANO et al., 1976; DOTT et al., 1976; 1977; DOTT und TRÜPER, 1976; 1978 b; 1979; HEINZEL und TRÜPER, 1976; 1978; BAUMGARTEN, 1981).
Es ist nicht ein einzelner Stoffwechseldefekt verantwortlich, sondern verschiedene Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion weisen Unterschiede zu den Normalstämmen (keine oder nur geringe Sulfitbildung; ESCHENBRUCH, 1974) auf. Diese betreffen sowohl die Enzymaktivität als auch die Enzym-Biosynthese. Die Fehlregulationen sind genetisch bedingt und damit unter standardisierten Bedingungen (DOTT und TRÜPER, 1978a) ein konstantes, stammspezifisches Merkmal.

Für die Praxis bedeutet dies, daß es nicht ohne weiteres möglich ist, die Sulfitbildung im Wein zu verhindern. Alle Autoren kommen übereinstimmend zu dem Schluß, daß das Problem in der Praxis nur durch die Verwendung von Reinzuchthefen umgangen werden kann (DITTRICH, 1976; BIDAN und SALGUES, 1981).

Die Mehrzahl der Untersuchungen der letzten Jahre beschäftigt sich mit einem anderen Aspekt des Problems "Sulfit im Wein". Aufgrund der anstehenden Verringerung des SO_2-Gehaltes im Wein durch neue EG-Vorschriften steht die Frage der Senkung des SO_2-Bedarfs der Weine im Vordergrund. Nach SCHOBINGER (1981) kommen hierfür vor allem mikrobiologische Maßnahmen in Betracht, da die benötigte Sulfitmenge von mikrobiologischen Faktoren wie z.B. dem Gehalt an Carbonylverbindungen bzw. Carbonsäuren (DITTRICH et al., 1980), der Gärkraft der Hefen (DITTRICH, 1977; RADLER und SCHÜTZ, 1982) und der Thiaminkonzentration des Mostes (DITTRICH et al., 1975; WÜRDIG, 1982) bestimmt wird. Die stärkste Einsparung an SO_2 wird daher durch die Kombination verschiedener mikrobiologischer Maßnahmen erzielt (DITTRICH, 1982).
Eine weitere Möglichkeit, die Eigenschaften von Weinhefen zu beeinflussen, besteht in der genetischen Veränderung geeigneter Stämme (THORNTON, 1982; ESCHENBRUCH et al., 1982).

Das Problem der Sulfitbildung ist nicht nur auf Weinhefen beschränkt. Auch im Bier läßt sich Sulfit nachweisen (KLOPPER, 1973; THALACKER und IHRING, 1974; TRESSL et al., 1975). Da der Sulfit-Gehalt des Bieres in Deutschland auf 10 mg SO_2/l begrenzt ist, kommt es immer wieder zu Ordnungswidrigkeitsanzeigen gegen die Brauereien (VOERKELIUS, 1982). Untersuchungen machten deutlich, daß das im Bier vorhandene Sulfit ausschließlich auf den Stoffwechsel der Hefen zurückzuführen ist (VERPACHTERT et al., 1980; THALACKER und KALTWASSER, 1981; BASAŘOVÁ und MIKYSKA, 1982). Die Forschungen auf diesem Gebiet gelten hier dem Bemühen, die Sulfitbildung durch Hefen zu senken (NARZISS, 1982; BASAŘOVÁ und MIKYSKA, 1982; NARZISS et al., 1982; VOERKELIUS, 1982).

Die Untersuchungen über die Ursachen der Sulfitbildung durch Hefen haben gezeigt, daß aufgrund mehrerer Stoffwechseldefekte intrazellulär das toxische Produkt Sulfit gebildet wird. Ungeklärt blieb jedoch bislang die Frage, wie sich die Zellen dieses Zellgiftes entledigen. Ein effektiver Transportmechanismus muß gewährleistet sein, um eine Selbstvergiftung der Zellen zu verhindern. Mit der Frage des Sulfit-Transports aus der Zelle beschäftigen sich die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

In Versuchen über den Sulfit-Transport müssen die zelltoxischen Eigenschaften des Sulfits mit berücksichtigt werden. Daher wird im folgenden Abschnitt auf die chemischen Eigenschaften der schwefligen Säure und ihrer Salze sowie ihre Reaktionen mit essentiellen Molekülen der lebenden Zelle eingegangen.

1.2 Sulfit als Zellgift

Sulfit nimmt unter den Zellgiften eine Sonderstellung ein. Zwar ist seine Toxizität in vielen Fällen eindeutig nachgewiesen (s.u.), jedoch kann es unter bestimmten Bedingungen auch als Schwefelquelle dienen (LUKASZKIEWICZ und PIENIĄŻEK, 1972; ESCHENBRUCH et al., 1973; ZIEGLER und HAMPP, 1977; SOLDATINI et al., 1978; SPEDDING et al., 1980b).

Auch Vertreter der Weinforschung weisen darauf hin (DITTRICH, 1982), daß eindeutige Beweise der Schädlichkeit des bei der Weinerzeugung verwendeten Sulfits ausstehen. Man verweist dabei besonders auf die Entgiftung dieser Verbindung in Säugetieren durch das Enzym Sulfitoxidase (COHEN und FRIDOVICH, 1971; COHEN el al., 1973) und die Reversibilität vieler Reaktionen des Sulfit-Moleküls. Jedoch führt das Wissen um die Toxizität des Sulfits auf molekularer Ebene zu der Empfehlung von Seiten der Forschung, die SO_2-Konzentrationen im Wein so gering wie möglich zu halten, bis eindeutige Ergebnisse vorliegen (SHAPIRO, 1977).

Für eine Begrenzung des Sulfitgehalts sprechen auch nachweislich sulfitbedingte Krankheitssymptome (LANG, 1960; SCHROETER, 1966; PFLEIDERER et al., 1968; CHICHESTER und TANNER, 1972; PETERING und SHIH, 1975).

Schwefeldioxid ist ein farbloses, stechend riechendes Gas, das in wässriger Lösung in verschiedenen molekularen Formen vorliegt. Die Dissoziation erfolgt nach folgender Gleichung

$$SO_2+H_2O \rightleftharpoons SO_2xH_2O \overset{K_1}{\rightleftharpoons} H^+ + HSO_3^- \overset{K_2}{\rightleftharpoons} 2H^+ + SO_3^{=}$$

Die undissoziierte Form H_2SO_3 kann nicht nachgewiesen werden (JONES und McLAREN, 1958). In konzentrierteren Lösungen (< 10 mM) bildet sich eine weitere Form (SIMON und WALDEMANN, 1956; GOLDING, 1960), das Disulfit (Pyrosulfit, Metabisulfit) nach der Gleichung:

$$2\ HSO_3^- \rightleftharpoons S_2O_5^{=} + H_2O$$

Es spielt jedoch für die folgenden Untersuchungen keine Rolle, da überwiegend in einem niedrigeren Konzentrationsbereich gearbeitet wurde. Für die weiteren Betrachtungen sind daher die drei Formen SO_2 (gasförmig), HSO_3^- und $SO_3^{=}$ von Bedeutung. Das Gleichgewicht zwischen diesen Molekülen wird hauptsächlich vom pH-Wert der Lösung, zusätzlich auch von der Temperatur und der Ionenstärke bestimmt (SHAPIRO, 1977). Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt in Bruchteilen einer Sekunde (EIGEN et al., 1961; BEILKE und GRAVENHORST, 1974).

MACRIS (1972) legt für seine Berechnung der prozentualen Verteilung der 3 Molekülformen die Werte $pK_1=1.81$ und $pK_2=6.91$ (WEAST, 1970) zugrunde. Die daraus resultierende Verteilung ist in Abb. 1 dargestellt. Wie diese Berechnungen zeigen, sind die 3 Formen bei jedem pH-Wert in unterschiedlicher Konzentration vorhanden.

Im folgenden wird unter dem Begriff Sulfit die Summe aller drei Formen zusammengefaßt, wenn es nicht von Bedeutung ist, die einzelnen Moleküle zu unterscheiden. Ansonsten finden die Bezeichnungen SO_2 (gasförmig), HSO_3^- (Bisulfit) und $SO_3^=$ Verwendung.

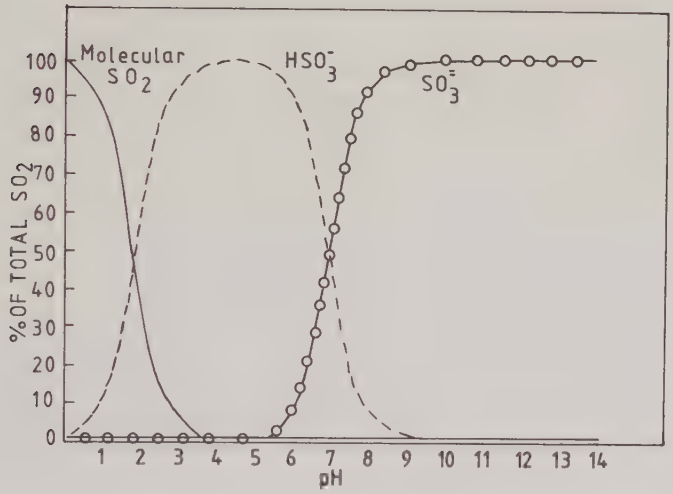

Abb. 1: Prozentuale Verteilung von molekularem SO_2, Bisulfit (HSO_3^-) und Sulfit ($SO_3^=$) als Funktion des pH-Wertes in einer wässrigen Sulfitlösung (MACRIS, 1972)

Die Toxizität des Sulfits auf molekularer Ebene ist vor allem auf das Bisulfit (HSO_3^-) - Molekül wegen seiner großen Reaktivität zurückzuführen (SHAPIRO, 1977). Es reagiert ohne Aktivierung durch den Stoffwechsel mit einer großen Anzahl von organischen und anorganischen Molekülen (SCHROETER, 1966; PETERING und SHIH, 1975). Die wichtigsten Reaktionstypen lassen sich in folgenden Gruppen zusammenfassen:

(1) Addition an Carbonylgruppen
(2) Spaltung von Disulfidbrücken ("Sulfitolyse")
$RSSR' + HSO_3^- \rightleftharpoons RSSO_3^- + R'SH$
(3) Bildung von Radikalen bei der Oxidation zu Sulfat. Dabei treten Radikale der Form $\cdot SO_3^-$ und $\cdot OOH$ auf (SHAPIRO, 1977), die relativ unspezifisch mit anderen Verbindungen reagieren.

Die Toxizität auf zellulärer Ebene wird dagegen übereinstimmend von allen Autoren und bei allen Mikroorganismen mit sinkendem pH-Wert festgestellt und kann, soweit detaillierte Untersuchungen zu diesem Punkt durchgeführt wurden, auf das SO_2-Molekül zurückgeführt werden (REHM und WITTMANN, 1963a und b; BURROUGHS und SPARKS, 1964; CARR et al., 1976; WODZINSKY et al., 1978; SCHIMZ, 1980; SPEDDING et al., 1980a und b).
Zwei Möglichkeiten sind für diesen Effekt denkbar:
(1) das SO_2-Molekül wird besser aufgenommen
(2) das SO_2-Molekül selbst ist das zelltoxische Agens.
Ob das undissoziierte Molekül tatsächlich für die geschilderten hemmenden, mutagenen bzw. letalen Effekte verantwortlich ist, muß noch geklärt werden. Seine Toxizität wird übereinstimmend von der Mehrzahl der Autoren auf das schnelle, ungehinderte Eindringen in Zellen und Zellorganellen zurückgeführt (REHM und WITTMANN, 1963a; CHICHESTER und TANNER, 1972; DORANGE und DUPUY, 1972; SPEDDING et al., 1980b), wo es dann aufgrund des intrazellulären pHs durch Umwandlung zu HSO_3^- seine zelltoxische Wirkung entfaltet (SCHIMZ und HOLZER, 1977). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß das SO_2-Molekül selbst als Zellgift wirkt (SPEDDING et al., 1980b; SCHIMZ, 1980; ANACLETO und VAN UDEN, 1982).

Sulfit ist ein wichtiges Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie (CHICHESTER und TANNER, 1972; REHM und WITTMANN, 1963a) und gleichzeitig zunehmend als Umweltgift bekannt geworden (BABICH und STOTZKY, 1974; ZIEGLER, 1975; LIKENS et al., 1979). Aus diesem Grunde wurde der Einfluß dieser Substanz auf Organismen, Zellen, Zellorganellen und lebenswichtige Moleküle häufig untersucht. Unter den Molekülen, die Reaktionen mit Sulfit einge-

hen, befinden sich Metabolite wie NAD (PFLEIDERER et al., 1956), Folsäure, Flavine, Vitamin K (PETERING und SHIH, 1975), Thiamin (LEICHTER und JOSLYN, 1969) und Aminosäuren (INOUE und HAYATSU, 1971, KAPLAN et al., 1975). Aus diesen Reaktionen resultieren wiederum Eingriffe in wichtige Stoffwechselprozesse.
Besonders schwerwiegend sind Wechselwirkungen des Sulfits mit enzymatischen Prozessen. Der Einfluß erfolgt über verschiedene Mechanismen. Schon WYSS (1948) wies eine irreversible Schädigung bestimmter Enzyme durch Spaltung von Disulfidbrücken nach (siehe auch REHM und WITTMANN, 1963a). Auf die Reaktion mit Kofaktoren von Enzymen wurde bereits hingewiesen (s.o.). Neuere Untersuchungen, die sich mit der kinetischen Analyse der Sulfithemmung befassen, ergaben kompetitive, nicht-kompetitive und gemischte Hemmtypen (SCHIMZ und HOLZER, 1977; RABE und KREEB, 1980), ein Hinweis auf die Vielseitigkeit der Wechselwirkungen des Sulfits mit Enzymen. Ein weiterer Einfluß auf enzymkatalysierte Prozesse ist indirekter Art. WYSS (1948) und REHM und WITTMANN (1963a) weisen auf den Eingriff in den Ablauf enzymatischer Reaktionen durch Abfangen eines Zwischen- oder Endprodukts hin. Auch MACRIS (1972) kommt aufgrund seiner Untersuchungen an Stämmen von Saccharomyces cerevisiae zu dem Schluß, daß eine wesentliche Ursache der Toxizität des Sulfits die Fähigkeit ist, sich an bestimmte Metabolite anzulagern und sie dadurch dem Stoffwechsel zu entziehen; ein Vorgang, der schließlich zum Zelltod führt.

Die Wirkung des Sulfits auf Mikroorganismen reicht in Abhängigkeit von der Konzentration und der Inkubationsdauer von einer Hemmung der Atmung, der Gärung und Glycolyse über eine Verringerung des Wachstums sowie eine Senkung des intrazellulären ATP-Gehalts bis zum Zelltod (MACRIS, 1972; MACRIS und MARKAKIS, 1974; WODZINSKY et al., 1978; SCHIMZ und HOLZER, 1979; SCHIMZ, 1980; KÖCK und SCHLEE, 1981; BAUMGARTEN, 1981).

Außerdem werden die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der Mikroflora des Bodens deutlich durch Sulfit verändert (INESON und GRAY, 1980; BEWLEY und PARKINSON, 1984; BEWLEY und PARKINSON, 1985).

Die mutagene Wirkung des Sulfits (BABICH und STOTZKY, 1974; SHAPIRO, 1977; FISHBEIN, 1976; GUERRA et al., 1981) beruht auf Desaminierungs- und Transaminierungsreaktionen, Addition an DNA-Bestandteile und Kettenreaktionen durch Radikalbildung.

Die Wechselwirkung von Sulfit mit Membrankomponenten ist im Hinblick auf Transportvorgänge von Bedeutung. Erwähnt werden muß in diesem Zusammenhang die Oxidation von Lipiden (KAPLAN et al., 1975) und die Fähigkeit, sich an Kohlenstoff-Doppelbindungen anzulagern (HAYATSU, 1976). Bei Hefen gibt es mehrere Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen Sulfit und der Cytoplasmamembran. ANACLETO und VAN UDEN (1982) nehmen aufgrund ihrer Ergebnisse eine Bindung von Sulfit an Proteinrezeptoren der Oberfläche der Cytoplasmamembran an. Dieser Vorgang führt schließlich zu einer Zerstörung der Integrität der Membran. SCHIMZ und HOLZER (1979) gehen davon aus, daß Sulfit eine membrangebundene ATPase beeinflußt, die eine schnelle Hydrolyse von intrazellulärem ATP verursacht. Beide Hypothesen würden u.a. die Schnelligkeit und den hohen Temperaturquotienten der Sulfitwirkung erklären. Indirekte Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen Sulfit und Membran fand SCHIMZ (1980) bei dem Vergleich der Sulfitempfindlichkeit haploider und diploider Hefestämme, die sich auch im Hinblick auf ihre Oberflächenbeschaffenheit unterschieden (WEISS et al., 1975). Es zeigte sich, daß dementsprechend auch eine unterschiedliche Sulfitempfindlichkeit festzustellen war. FREEZE und Mitarbeiter (1973) weisen nach, daß die antimikrobielle Wirksamkeit schwacher Säuren, wie z.B. Benzoesäure und Sorbinsäure, u.a. auf die Hemmung von Transportvorgängen zurückzuführen ist. Für Sulfit gilt diese Feststellung nicht. Allerdings werden die Ergebnisse dieser Autoren durch Unvollständigkeit der Sulfit-Versuchsreihen und Probleme mit der Autoxidation geschmälert.

1.3 Sulfit- und Sulfat-Transport

Trotz zahlreicher Untersuchungen über die zelltoxische Wirkung des Sulfits existieren nur vergleichsweise wenige Arbeiten, die sich mit dem Transport dieser wichtigen Substanz beschäftigen, obwohl er die Voraussetzung für die meisten weiteren Effekte darstellt.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zum Sulfit-Transport bei Mikroorganismen und Pflanzen machen deutlich, daß verschiedene Mechanismen verantwortlich sind. Zum einen passiert das SO_2-Molekül die Cytoplasmamembran durch einfache Diffusion, ein Mechanismus, der auch bei anderen schwachen Säuren verwirklicht ist (WYSS, 1948; BOSUND, 1962). Dieser Transportweg dominiert bei niedrigem pH-Wert, besonders aufgrund seiner Schnelligkeit und seiner Unabhängigkeit von bestimmten Membrankomponenten und regulatorischen Einflüssen.

Zusätzlich ist jedoch auch der Transport von Sulfit als Anion nachgewiesen oder zumindest aufgrund experimenteller Hinweise möglich. Eine eindeutige Klärung dieser Frage scheitert oft an der Tatsache, daß in der Regel alle drei oder zumindest zwei Formen gleichzeitig in der zu messenden Lösung vorhanden sind. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei anderen Verbindungen, die in wässriger Lösung in verschiedenen molekularen Formen vorliegen. Zu denken ist beispielsweise an Ammoniak (LAANE et al., 1980; KLEINER, 1981; BARNES und ZIMNIAK, 1981), Amine (KNOTH, 1981; MACFARLANE und SMITH, 1982) und Kohlensäure (BORON, 1983; LOWE und LAMBERT, 1983).

Den experimentellen Nachweis, daß tatsächlich das SO_2-Molekül in die Zelle gelangt, erbrachten MACRIS und MARKAKIS (1974) bei Hefen der Gattung Saccharomyces. Die Autoren konnten zeigen, daß es sich um einen extrem schnellen Vorgang handelt. Das Maximum der Aufnahme wird in weniger als zwei Minuten erreicht, und eine Linearität ist nur in den ersten 10 Sekunden gegeben.

Auch DORANGE und DUPUY (1972) gehen davon aus, daß nur das SO_2-Molekül in die Zelle einzudringen vermag, da nur bei niedrigem pH-Wert mutagene Effekte bei Hefen nachgewiesen werden können. Bei pH 5.0 konnte auch bei dreifacher Konzentration im Vergleich zu pH 3.6 kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (Zellen ohne Sulfitbehandlung) festgestellt werden. Die Autoren führen diesen Effekt darauf zurück, daß Sulfit nur bei hoher Wasserstoffionenkonzentration, d.h. als SO_2, aufgenommen werden kann.

Die Untersuchungen zum Sulfit-Transport bei Chloroplasten und Mitochondrien ergaben ein ähnliches Bild wie die Verhältnisse bei Mikroorganismen; sowohl der Transport als Anion als auch einfache SO_2-Diffusion finden statt. In beiden Fällen war es sogar möglich, den Träger zu ermitteln, über den Sulfit als Anion transportiert wird.

CROMPTON et al.(1974) konnten durch Untersuchungen an Mitochondrien nachweisen, daß sowohl Sulfit als auch Sulfat die Membran mit Hilfe des Dicarbonsäure-Trägers durchquert, der neben Malat, Succinat und Malonat auch Phosphat transportiert. Die Aufnahme erfolgt jeweils im Austausch gegen eines der anderen Anionen. Im Falle des Sulfits wurde jedoch noch ein weiterer Transportmechanismus nachgewiesen, der unabhängig vom Dicarbonsäureträger funktioniert. Eine Aufnahme im Cotransport mit Protonen bzw. Kationen oder einfache Diffusion als SO_2 werden diskutiert.
Auch der Sulfit-Transport in Chloroplasten verläuft über zwei verschiedene Wege. Die Translokation des Sulfit-Anions (HAMPP und ZIEGLER, 1977; ZIEGLER und HAMPP, 1977; MOURIOUX und DOUCE, 1979) erfolgt durch das Phosphat-Transportsystem (FLÜGGE und HELDT, 1976), das den Austausch von Phosphat, Phosphoglycerinsäure und Dihydroxyacetonphosphat gegen die Schwefelanionen Sulfat und Sulfit vermittelt. Zusätzlich zu diesem Transportweg findet noch eine unspezifische SO_2-Diffusion statt (HAMPP et al., 1980; SPEDDING et al., 1980a).

SPEDDING et al. (1980b) wiesen bei Chlorella vulgaris nach, daß bei niedrigem pH-Wert das SO_2-Molekül bevorzugt und schnell transportiert wird. Bei pH 5.8, wenn keine meßbaren Mengen an SO_2 vorliegen, wird eher eine Aufnahme der ionisierten Form HSO_3^- vermutet (SOLDATINI et al., 1980), möglicherweise über das von WEDDING und BLACK (1960) nachgewiesene Sulfat-Transportsystem.

Die Möglichkeit eines Sulfit-Transports durch den Sulfatträger wurde von verschiedenen Autoren in Erwägung gezogen (s.u.).

Im Gegensatz zum Sulfit-Transport ist die Aufnahme von Sulfat, der wichtigsten Schwefelquelle von Mikroorganismen und Pflanzen, gut untersucht (LEGGET und EPSTEIN, 1956; SCHIFF und HODSON, 1973; BORST-PAUWELS, 1981; EDDY, 1982). Die Untersuchungen zur Sulfataufnahme ergaben bei allen Organismen wesentliche Übereinstimmungen. Dies gilt sowohl für Pilze und Bakterien, als auch für Algen und höhere Pflanzen.

Es handelt sich um einen trägervermittelten Transport, der das Substrat gegen einen Konzentrationsgradienten, also aktiv, transportiert. Er wird durch den elektrochemischen Protonengradienten energetisiert und ist durch Entkoppler wie CCCP, DNP und Azid hemmbar. Die Aufnahme erfolgt im Cotransport mit Protonen oder Kationen. Dieser Vorgang wurde bei Hefen näher analysiert. ROOMANS et al. (1979) stellten fest, daß die Sulfataufnahme von einem Protoneninflux begleitet wird. Die kinetische Analyse dieses Vorgangs ergab, daß drei Protonen- und ein Sulfat-Molekül an den Träger binden, der dann als positiv geladener Komplex die Membran durchquert. Die Ladungskompensation erfolgt durch den Efflux von Kalium-Ionen.
Die Sulfat-Aufnahme unterliegt einer strengen Regulation auf verschiedenen Ebenen. Sie betrifft sowohl die Synthese (Repression) als auch katalytische Aktivität des Transportproteins.

Der Einfluß auf die Trägeraktivität entspricht der Endprodukthemmung der Enzyme und wird bei Transportvorgängen auch als "Transinhibition" bezeichnet (MARZLUF, 1975), da der Einfluß der hemmenden Substanz auf der gegenüberliegenden Seite der Membran ausgeübt wird und auf Wechselwirkungen mit der intrazellulären Form des Trägers beruht.

Trotz der auffallenden Gemeinsamkeiten der Sulfat-Transportsysteme bei allen Organismengruppen gibt es auch Unterschiede, z.B. im Hinblick auf den Sulfat-Efflux. Der Transport verläuft "unidirektional", d.h. es findet kein experimentell nachweisbarer Austausch zwischen intrazellulär akkumuliertem und externem Sulfat statt (WEDDING und BLACK, 1960; VALLEE und JEANJEAN, 1968a; BRADFIELD et al., 1970; DEANE und O'BRIEN, 1975; JEANJEAN und BRODA, 1977, CUHEL et al., 1981). Auch durch Waschen kann in diesen Fällen kein intrazelluläres Sulfat aus den Zellen extrahiert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß das aufgenommene Sulfat sehr schnell metabolisiert wird. Daher können Aussagen über einen möglichen Sulfat-Efflux nur durch die Untersuchungen von Mutanten gemacht werden, die Sulfat nicht reduzieren können (MARZLUF, 1974). Auch muß die intrazelluläre Sulfatkonzentration hoch genug sein, damit ein Efflux überhaupt nachweisbar ist.
Neben den oben erwähnten "unidirektionalen" Systemen konnte unter bestimmten Bedingungen in anderen Fällen ein Sulfat-Efflux beobachtet werden, wie z.B. bei Neurospora crassa (MARZLUF, 1974), Salmonella typhimurium (DREYFUSS, 1964; DREYFUSS und PARDEE, 1966) und Penicillium chrysogenum (YAMAMOTO und SEGEL, 1966; CUPPOLETTI und SEGEL, 1974). Der Efflux war nach Zugabe extrazellulären Sulfats oder eines seiner Analoga meßbar. Es erfolgte ein Austausch zwischen externem und internem Anion über das Sulfat-Transportsystem (MARZLUF, 1974). Der k_m-Wert des Efflux liegt um den Faktor 2×10^3 höher als der des Influx, so daß ein deutlicher Sulfat-Gradient aufgebaut werden kann, bevor ein Efflux stattfindet. Damit haben die Zellen noch eine weitere Möglichkeit, den Sulfat-Transport zu regulieren.

Auf einen Sulfit-Transport über den Sulfat-Träger wird von verschiedenen Arbeitsgruppen hingewiesen. Sie kommen zu diesem Schluß durch Untersuchungen zum Transport anderer Anionen der Gruppe VI des Periodensystems, wie z.B. $SO_4^{=}$, $SeO_3^{=}$, $SeO_4^{=}$, $CrO_4^{=}$, $MoO_4^{=}$ und $S_2O_3^{=}$.
In vielen Fällen konnte durch Konkurrenzexperimente, den Vergleich der Transporteigenschaften der verschiedenen Substratanaloga und schließlich durch Isolierung von transportdefekten Mutanten gezeigt werden, daß bestimmte Anionen aus der Gruppe VI des Periodensystems über denselben Träger die Membran durchqueren (DREYFUSS, 1964; YAMAMOTO und SEGEL, 1966; VALLEE und JEANJEAN, 1968a; TWEEDIE und SEGEL, 1970; CUPPOLETTI und SEGEL, 1974; MARZLUF, 1970a; McKILLEN und SPENCER, 1970; ROBERTS und MARZLUF, 1971; BROWN und SHRIFT, 1980; CUHEL et al., 1981).
Für einen Sulfit-Transport über den Sulfat-Träger sprechen Untersuchungen an verschiedenen Mikroorganismen zum Einfluß von Sulfit auf die Sulfataufnahme. In allen Fällen wird der Sulfat-Transport deutlich durch Sulfit gehemmt (KOTYK, 1959; KLEINZELLER et al., 1959; TWEEDIE und SEGEL, 1970; BRADFIELD et al., 1970; MARZLUF, 1970b; MARZLUF, 1974; CUPPOLETTI und SEGEL, 1974). Die meisten Autoren beschränken sich in ihren Untersuchungen jedoch auf die Ermittlung der prozentualen Hemmung der Sulfataufnahme. Weiterführende Untersuchungen, wie beispielsweise die gegenseitige Hemmbarkeit, also auch die Untersuchung der Sulfitaufnahme im Hinblick auf den Einfluß von Sulfat oder der Einsatz von Mutanten wurden nur in wenigen Fällen durchgeführt (TWEEDIE und SEGEL, 1970; LUKASZKIEWICZ und PIENIĄŻEK, 1972; MARZLUF, 1970a), so daß ein eindeutiger Beweis für die Hypothese eines gemeinsamen Trägers für Sulfat und Sulfit noch aussteht.
Dagegen gibt es in einigen Fällen Hinweise darauf, daß eine Sulfitaufnahme auch unabhängig vom Sulfat-Träger erfolgen kann. Verschiedenen Arbeitsgruppen gelang es, Mutanten von Aspergillus nidulans (LUKASZKIEWICZ und PIENIĄŻEK, 1972) und Neurospora crassa (MARZLUF, 1970a) zu isolieren, denen das Sulfat-Transportsystem fehlte. Diese Stämme waren nicht in der Lage,

Sulfat, Chromat und Selenat in die Zelle aufzunehmen. Dagegen konnten sie mit Sulfit als einziger Schwefelquelle wachsen. Dies bedeutet, daß die Wildstämme nicht nur über den Sulfat-Träger, sondern zusätzlich über eine von ihm unabhängige Möglichkeit der Sulfit-Aufnahme verfügen.
Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen ESCHENBRUCH und Mitarbeiter (1973) durch Untersuchungen mit Saccharomyces cerevisiae. Bei Wachstum auf Methionin, d.h. bei reprimiertem Sulfat-Transportsystem, findet trotzdem eine Sulfitaufnahme und anschließende Reduktion zu Sulfid statt.
Bei den geschilderten Fällen wird die Sulfitaufnahme nicht näher untersucht. Es kann sich dabei sowohl um erleichterte Diffusion der Anionen als auch um einfache Diffusion des SO_2-Moleküls handeln.

Detaillierte Studien zum Sulfit-Efflux gibt es nicht. In den oben erwähnten Fällen der Mitochondrien und Chloroplasten kann unter entsprechenden Bedingungen der Transport in beide Richtungen nachgewiesen werden.

1.4 Ziele der Arbeit

Die Arbeiten von DOTT (1977), HEINZEL (1978) und BAUMGARTEN (1981) haben die Ursachen des Phänomens "Sulfitbildung bei Weinhefen" weitgehend geklärt. Durch vergleichende Untersuchungen an Sulfitbildnern und Normalstämmen konnte die Sulfitbildung auf eine Fehlregulation der an der assimilatorischen Sulfatreduktion beteiligten Enzyme ATP-Sulfurylase (HEINZEL und TRÜPER, 1976; 1978), PAPS-Sulfotransferase (BAUMGARTEN, 1981), Sulfit-Reduktase (DOTT und TRÜPER, 1976; 1978b) und des Sulfat-Transportsystems (DOTT et al., 1977) zurückgeführt werden (vgl. Abb. 2).

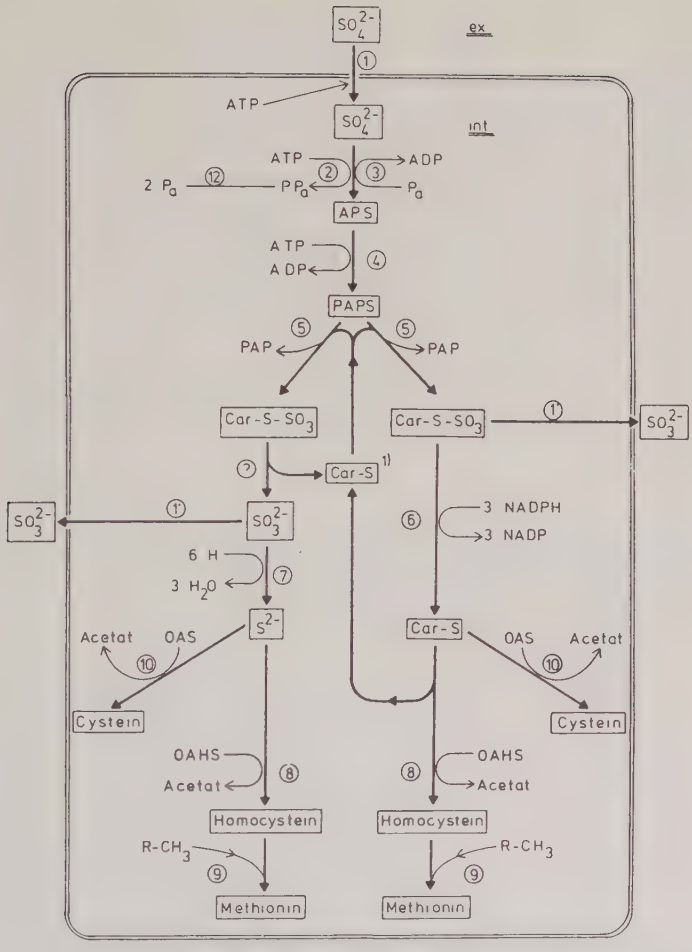

Abb. 2: Assimilatorische Sulfatreduktion bei Hefen (BAUMGARTEN, 1981)

1 Sulfat-Permease; 1' Sulfit-Permease ($\stackrel{?}{=}$1); 2 ATP-Sulfurylase; 3 ADP-Sulfurylase; 4 APS-Kinase; 5 PAPS-Sulfotransferase; 6 Thiosulfonatreduktase; 7 Sulfitreduktase; 8 OAHS-Sulfhydrylase; 9 Methyltransferase; 10 OAS-Sulfhydrylase; 11 Pyrophosphatase; ? wahrscheinlich spontan; 1) CAR-S = Carrier; int. intrazellulär; ex extrazellulär.

Ungeklärt blieb jedoch die Frage, auf welchem Wege das produzierte Sulfit aus der Zelle transportiert wird. Lediglich eine Möglichkeit - der Efflux über das Sulfat-Transportsystem - wurde von HEINZEL (1978) diskutiert.

Der Klärung dieser Frage und einer Charakterisierung des Sulfit-Efflux galten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Es sollte geprüft werden, ob der Sulfit-Efflux durch ein Sulfit-spezifisches oder ein anderes Transport-System vermittelt wird, und ob einfache SO_2-Diffusion oder ein katalysierter Transport als Anion für den Efflux verantwortlich ist.

In diesem Zusammenhang erwies es sich als notwendig, die Sulfataufnahme und den Einfluß von Sulfit auf den Sulfat-Transport zu untersuchen.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war eine Analyse der intrazellulären Schwefelverbindungen bei sulfitbildenden und normalen Stämmen. Dies war für eine korrekte Interpretation der Untersuchungen zum Sulfit-Efflux erforderlich.

2. Material und Methoden

2.1 Organismen

Stamm 2: *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* HANSEN (ATCC 42507)

Stamm 27: *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* HANSEN (ATCC 42508)

Stamm 36: *Saccharomyces bayanus* SACCARDO

Stamm V 10-25-15 *Saccharomyces bayanus* SACCARDO (ATCC 42506)

Die Stämme 2, 27 und 36 wurden aus gärendem Traubenmost des Trierer Weinbaugebietes isoliert und von Dr. E. MINARIK (Forschungsinstitut für Weinbau und Önologie, Bratislava, Tschechoslovakei), der auch den Stamm V 10-25-15 zur Verfügung stellte, bestimmt.
St. 2 und V 10-25-15 bilden während der Gärung sehr wenig oder kein Sulfit; St. 27 und St. 36 sind starke Sulfitbildner.

2.2 Nährmedien

2.2.1 Komplexer Nähragar

Hefeextrakt	10 g/l
Pepton	10 g/l
Glucose	20 g/l
Agar	20 g/l

Der Agar wird gelöst und bei einer Temperatur von 50°C mit NaOH auf pH 7,0 gebracht. Der autoklavierte Agar wird zur Herstellung von Schrägagarröhrchen für die Stammhaltung (2.3) verwendet.

2.2.2 Synthetische Nährlösung (anaerobe Anzucht)

$(NH_4)_2HPO_4$	3.96 g/l
KH_2PO_4	1.36 g/l
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	2.03 g/l
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0.29 g/l
Bernsteinsäure	3.36 g/l
myo-Inosit	0.5 g/l
Glucose	150 g/l
Vitaminlösung (s.u.)	10 ml/l
Spurenelementlösung (s.u.)	1 ml/l
Ergosterinlösung (s.u.)	16 ml/l

Für aerobe Wachstumsversuche wurden 40 g Glucose (statt 150 g) verwandt. Außerdem wurde keine Ergosterinlösung zugegeben, da Hefen unter diesen Bedingungen Steroidsynthese betreiben können (ANDREASEN und STIER, 1953).

Vitaminlösung	
Nicotinsäure	100 mg/l
Na-Citrat	100 mg/l
p-Aminobenzoesäure	100 mg/l
Pyridoxal-HCl	100 mg/l
Thiamin-HCl	100 mg/l
Ca-D-Panthothenat	100 mg/l
Biotinlösung (10 mg/10 ml Äthanol)	10 ml/l

Spurenelementlösung	
$FeCl_3 \times 6\ H_2O$	1 g/l
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	100 mg/l
$ZnCl_2$	50 mg/l
LiCl	5 mg/l
KJ	2,5 mg/l
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	10 mg/l
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	50 mg/l
$AlCl_3$	10 mg/l
H_3BO_3	100 mg/l
$CuCl_2 \times 2\ H_2O$	0,05 mg/l

Ergosterinlösung

4,376g Ergosterin wurden mit 400 ml Tween 80 und 600 ml unvergälltem Äthanol bis zur vollständigen Lösung erhitzt. Die verdunstete Flüssigkeit wurde nach dem Abkühlen durch Äthanol ersetzt.

Das Medium (End-pH: 5.0 - 5.2) wurde durch einen Sterilfilter (Merkur EF 14/0; Fa. Seitz, Bad Kreuznach) mit Stickstoff als Druckgas filtriert.

Je nach den Anzuchtbedingungen wurden zu diesem Grundmedium folgende Schwefelquellen zugesetzt:

Na_2SO_4	7,5 mM
Methionin	1,5 mM
Cystein	1,5 mM

2.3 Stammhaltung

Die Stammkulturen der Versuchsstämme wurden auf Schrägröhrchen mit komplexem Nähragar (vgl. 2.2.1) gezogen. Um eine generative Entwicklung und damit eine Veränderung des Merkmals Sulfitbildung zu vermeiden (DOTT, 1977), wurden die Hefen alle 6 - 8 Wochen auf neuen Schrägagar überimpft.

2.4 Zellanzucht

2.4.1 Vorkulturen

Die Vorkulturen wurden immer auf dem gleichen Medium angezogen, das auch für die Hauptkulturen vorgesehen war. Das jeweilige Medium (aerob oder anaerob) mit der entsprechenden Schwefelquelle wurde mit einem Inokulum von einem Schrägagarröhrchen beimpft und 2 - 3 Tage bei 25°C (bei Wachstum mit Glycerin 7 Tage) inkubiert. Die Kultur wurde anschließend zweimal in Medium ohne Schwefelquelle suspendiert und zentrifugiert. Die gewaschenen Zellen

dienten zum Animpfen der Hauptkultur. Es wurde jeweils soviel Zellmaterial in die Hauptkultur eingebracht, daß diese eine optische Dichte von 0.2 (gemessen bei 600 nm) aufwies.

2.4.2 Anaerobe Anzucht

Je nach benötigter Menge Zellsuspension erfolgte die Inkubation in 250 ml- bzw 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Gäraufsatz oder in 1 l - Enghals-Erlenmeyerkolben mit doppelt durchbohrtem Gummistopfen. Durch die erste Bohrung führte ein Gäraufsatz, durch die zweite ein Glasrohr zur Begasung der Kultur. Die Gefäße waren mit 200 ml, 450 ml bzw. 900 ml Medium gefüllt. In allen Fällen diente ein Magnetstab zur Durchmischung der Kultur. Die Inkubation erfolgte im Brutraum bei 25° C.

2.4.3 Aerobe Anzucht

Für die aerobe Anzucht wurde das unter 2.2.2 beschriebene Medium verwandt, mit jeweils unterschiedlichen Kohlenstoff-Quellen. Die Anzucht erfolgte in Erlenmeyerkolben verschiedener Größe, die höchstens bis zu einem Drittel mit Nährlösung gefüllt und mit einem Wattestopfen verschlossen waren. Die Inkubation erfolgte im Brutraum auf einem Schüttler bei 25° C.
Für die Bestimmung der intrazellulären Sulfit-Konzentration wurden relativ große Zellmengen benötigt. Daher erfolgte die Anzucht in 2 l - Erlenmeyerkolben, die mit 800 ml Glycerinmedium gefüllt waren.

2.4.4 Zellanzucht mit radioaktiv markiertem Sulfat

Die Anzucht mit radioaktiv markiertem Sulfat erfolgte stets unter anaeroben Bedingungen (anaerobes Medium mit 7.5 mM Sulfat, vgl. 2.2.2). Pro 50 ml Zellsuspension wurde 10 µCi ^{35}S-Sulfat als Na_2SO_4 in wässriger Lösung zugegeben. Die Inkubationszeit der

Kultur betrug 3 Tage bei 25°C. Ein Magnetstab diente zur Durchmischung der Kultur.
Um ein Entweichen des während des Wachstums gebildeten radioaktiven Sulfits zu verhindern, erfolgte die Anzucht in Glaszylindern mit Schliff, die durch einen doppelt durchbohrten Glasaufsatz verschlossen waren. Die bei der Gärung entstehenden Gase wurden durch zwei Vorlagegefäße mit Fritte geleitet, die zur Absorption des gebildeten SO_2 25 ml 0.1 N NaOH enthielten. Die Anzucht erfolgte im Wasserbad unter dem Abzug.

2.5 Messung des Wachstums

2.5.1 Trockengewichtsbestimmung

Die Trockengewichtsbestimmung erfolgte auf Membranfiltern (Firma Sartorius GmbH, Göttingen) mit der Porengröße 0.45 um und einem Durchmesser von 25 mm. Sie wurden in kleinen Schälchen aus Alufolie 15 Stunden bei 85°C im Trockenschrank getrocknet, nach Abkühlung im Exsikkator gewogen und anschließend in ein Membranfiltergerät eingelegt. Je nach Dichte der Zellsuspension wurden 2.0 bis 10.0 ml abgesaugt. Nach Waschen mit demineralisiertem Wasser wurden die Filter erneut unter den gleichen Bedingungen wie vorher getrocknet und nach Abkühlen im Exsikkator gewogen.

2.5.2 Proteinbestimmung an ganzen Zellen nach SCHMIDT et al. (1963)

Bestimmungsansatz:

4.0 ml Zellsuspension
0.4 ml Lösung A
1.6 ml Lösung B

Durchführung:

10 ml der Zellsuspension mit 0 - 8 mg Protein wurden zweimal mit 0.9% NaCl gewaschen, das Sediment anschließend in 4.0 ml demineralisiertem Wasser aufgenommen und mit 0.4 ml der Lösung A versetzt. Die Inkubationsdauer für das Reaktionsgemisch betrug 10 Minuten bei 100°C. Nach Abkühlung in Eis (10 Minuten) und Zugabe von 1.6 ml der Lösung B erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 20 Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert. Die Extinktionsmessung des Überstandes erfolgte bei 546 nm gegen einen Reagenzienleerwert. Die Proteinkonzentration war einer mit RSA erstellten Eichkurve zu entnehmen.

Reagenzien:

Lösung A: 16% NaOH
Lösung B: 5 g Na-K-Tartrat, 1 g $CuSO_4$ x 5 H_2O, 2 g KJ und 4 g NaOH in 400 ml demineralisiertem Wasser.

2.6 Analyse und chromatographische Trennung von Schwefelverbindungen

2.6.1 Sulfitbestimmung nach GRANT (1947)

Bestimmungsansatz:

1.0 ml Probe mit 0 - 0.3 µmol Sulfit
7.0 ml Zn-Acetatlösung
1.0 ml Fuchsinlösung
0.1 ml Formaldehydlösung

Durchführung:

6.9 ml der Probe wurden mit 2.0 ml Zn-Acetatlösung und 1.0 ml der Fuchsinlösung versetzt und gut

durchmischt. Nach 10-minütiger Inkubationsdauer bei Zimmertemperatur erfolgte die Zugabe von 0.1 ml der Formaldehydlösung. Nach weiteren 10 Minuten bei Zimmertemperatur wurde die Extinktion bei 570 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Die Messung mußte möglichst schnell erfolgten, da die Extinktion des entstandenen Farbkomplexes mit der Zeit abnahm.

Reagenzien:

2% Zn-Acetat; die Trübung der Lösung wurde durch Zugabe einiger Tropfen konzentrierter Essigsäure verhindert

0.04% Fuchsin in 10%iger H_2SO_4 gelöst

35% Formaldehyd

2.6.2 Sulfitbestimmung nach WEST und GAEKE (1957)

Bestimmungsansatz:

5.0 ml Probe mit 0 - 0.2 µmol Sulfit

1.0 ml Pararosanilin-Formaldehyd-Reagenz

Durchführung:

Die Proben wurden mit dem Reagenz versetzt, gut gemischt und nach 25 MInuten bei Zimmertemperatur gegen einen Reagenzienleerwert (bei 560 nm) gemessen.

Reagenzien:

a. 4.0 ml 1%ige wässrige Lösung von Pararosanilinhydrochlorid mit 6.0 ml konzentrierter HCl mischen und mit demineralisiertem Wasser auf 100 ml auffüllen. Haltbarkeit bei 4°C einen Monat.

b. 0.2%ige Formaldehydlösung. Zwei Wochen haltbar bei 4°C.

Lösung a. und b. im Verhältnis 1 : 1 mischen (Pararosanilin-Formaldehyd-Reagenz). Haltbarkeit auf Eis 4 Stunden.

2.6.3 Präparative Trennung von Sulfat und Sulfit auf Dowex-Ionenaustauscher nach IGUCHI (1958 a, b) und TRUDINGER (1964)

Es wurde Dowex-Ionenaustauscher Cl^--Form, 1X2, 200 - 400 mesh verwendet. Das einmal in 50 mM NH_4-Acetat (pH 5.0) gewaschene Gel wurde in Säulen der Abmessung 0.7 x 10 cm gefüllt (Gelhöhe ca 6 cm). Nachdem die Probe aufgetragen worden war, wurden $SO_3^=$ und $SO_4^=$ durch einen linearen Gradienten zwischen 50 mM und 3 M NH_4-Acetat (pH 5.0) eluiert. Das Gesamtvolumen des Elutionspuffers betrug 400 ml. Die Elutionsmolarität für $SO_3^=$ betrug 0.55 M und für $SO_4^=$ 1.2 M. Sulfit wurde colorimetrisch nach GRANT (1947) und Sulfat turbidometrisch nach DODGSON (1961) im Eluat lokalisiert.

2.6.4 Sulfitbestimmung nach PAUL (1958)

Zur nicht-radioaktiven Sulfitbestimmung wurde überwiegend diese Methode eingesetzt, obwohl sie im Vergleich zum colorimetrischen Test sehr ungenau und langwierig war. Es konnten maximal nur zwei Parallelproben gemessen werden. Jedoch ermöglichte allein diese Methode eine Unterscheidung zwischen freiem und gebundenem Sulfit sowie eine exakte Bestimmung des Gesamtsulfits.

2.6.4.1 Bestimmung des Gesamtsulfits

Bestimmungsansatz:

5.0 ml	25%ige Phosphorsäure
5.0 ml	50%iges Methanol
15.0 bzw 5.0 ml	3%iges H_2O_2, täglich frisch angesetzt mit Tashiro-Indikator (100 ml alkoholische Methylrotlösung, 0.03%ig, und 15 ml wässrige Methylenblaulösung, 0.1%ig) versetzt und mit 0.01 N NaOH bis zum Umschlagpunkt (Farbumschlag von rot über farblos nach grün) titriert
0.01 N	NaOH (Titrisol, Fa. Merck)

Durchführung:

Die Bestimmung erfolgte in einer Apparatur von LIEB und ZACHERL (Glasmanufaktur Saar, R. Greiner GmbH, Saarbrücken).
Zunächst wurden die Absorptionsgefäße mit 15 ml bzw. 5 ml frisch angesetzter H_2O_2 - Lösung gefüllt und die Wasserstrahlpumpe angeschlossen. 10 ml der zu untersuchenden Probe (Überstand einer 2-minütigen Zentrifugation in einer Tischzentrifuge) wurden in einen Destillationskolben pipettiert, der zuvor mit 5 ml 50%igem Methanol und 5 ml demineralisiertem Wasser beschickt worden war. Der Kolben wurde sofort an die Apparatur angeschlossen, anschließend der Tropftrichter mit der Phosphorsäure geöffnet und der Kolben mittels einer Bunsenbrennerflamme erhitzt. Das durch das Ansäuern und das Erhitzen freigesetzte SO_2 wurde durch den Luftstrom in die Absorptionsgefäße geleitet und zu Sulfat oxidiert. Der Destillationsvorgang dauerte 15 Minuten. Anschließend wurde der Inhalt beider Absorptionsgefäße vereinigt und mit soviel NaOH versetzt, daß der Farbumschlag von rot über farblos nach grün erfolgte. Dabei entsprach 1 ml 0.01 N NaOH 0.32 mg SO_2 in der Probe.
Bei der Auswertung der Versuche mit Nystatin war zu berücksichtigen, daß Nystatin diese Sulfitbestimmung beeinflußt. Die Ergebnisse lagen niedriger als in Proben ohne Nystatin. Daher mußten die Meßwerte um einen in Vorversuchen ermittelten Faktor korrigiert werden.

2.6.4.2 Bestimmung des freien und des gebundenen Sulfits

Der Reaktionsansatz ist der gleiche wie bei der Gesamtsulfitbestimmung. Um jedoch zwischen dem freien und dem an Aldehyde und Glucose gebundenen Sulfit zu unterscheiden, macht man sich die Tatsache zunutze, daß die Spaltung der Additionsprodukte des Sulfits (vgl. 3.2.1.4) durch Erwärmen stark beschleunigt wird.

Daher wurde zunächst, durch Destillation ohne Erhitzen des Kolbens, das freie Sulfit erfaßt. Es zeigte sich, daß durch eine Destillationsdauer von 30 Minuten das gesamte freie Sulfit bestimmt werden konnte.
Nach der Bestimmung des freien Sulfits erfolgte der Nachweis des gebundenen Sulfits durch 15-minütiges Erhitzen derselben Probe.

2.6.4.3 Sulfitbestimmung nach PAUL (1958), modifiziert

Um eine höhere Empfindlichkeit der Sulfitbestimmung durch Destillation zu erreichen, wurde die Titration durch eine colorimetrische Bestimmung ersetzt. Zu diesem Zweck wurde das entstandene SO_2 nicht in eine Lösung aus H_2O_2, sondern in eine 0.1 M Lösung von Na_2HgCl_4 (0.1 Mol $HgCl_2$ und 0.2 Mol NaCl in demineralisiertem Wasser gelöst und auf einen Liter aufgefüllt) geleitet (WEST und GAEKE, 1956). Der dabei entstehende $(Hg(SO_3)_2)^=$ - Komplex wurde anschließend einer Sulfitbestimmung durch das Pararosanilin-Formaldehyd-Reagenz unterworfen (vgl. 2.6.2). Zur Erstellung der Eichkurve wurde festes Na_2SO_3 in 0.1 M Na_2HgCl_4 gelöst.

2.6.5 Bestimmung von radioaktiv markiertem Sulfit

Bestimmungsansatz:

0.01 ml der Probe
1.0 ml 2 M HCl
1.0 ml 1 M Triäthanolamin

Durchführung:

Zum Nachweis radioaktiv markierten Sulfits wurde der PAPS-Sulfotransferase-Test nach TSANG und SCHIFF (1975) modifiziert. 0.01 ml des mit ^{35}S markierten Extrakts (vgl. 2.10) wurden in den Außenring einer Lips-Conway-Schale (Fa. Glaswerk, Wertheim) gegeben, in den zuvor 1 ml 2 M HCl pipettiert worden war. Nach

Aufsetzen des Schliffdeckels wurden die Lösungen im Außenring durch vorsichtiges Bewegen der Schale gemischt und zur Destillation bei Zimmertemperatur über Nacht inkubiert.
In dieser Zeit wird das durch Ansäuerung frei werdende $^{35}SO_2$ in der Triäthanolamin-Lösung absorbiert. 0.5 ml der Flüssigkeit im Zentralzylinder diente der Radioaktivitätsbestimmung (vgl. 2.13). Das Auszählen der Proben konnte erst einige Minuten nach Zugabe des Szintillators erfolgen, da erst nach dieser Zeit die Radioaktivität einen konstanten Wert erreichte.

2.6.6 Enzymatische Sulfitbestimmung nach BEUTLER und SCHÜTTE (1983)

Bei diesem Testsystem handelt es sich um eine Test-Kombination der Fa. Boehringer, Mannheim (Nr. 725854). Dieser Bestimmungsmethode liegt ein gekoppelter Enzymtest zugrunde. Sulfit wird durch das Enzym Sulfit-Oxidase zu Sulfat oxidiert. Das dabei entstehende H_2O_2 wird in Gegenwart von NADH durch NADH-Peroxidase reduziert. Als Meßgröße dient NADH, dessen Oxidation durch Bestimmung der Absorption bei 340 nm verfolgt wird. Die verbrauchte NADH-Menge entspricht der vorhandenen Menge an Sulfit. Mit dieser Methode wird auch das chemisch gebundene Sulfit erfaßt.

Bestimmungsansatz:

1.0	ml	Reaktionsgemisch 2
0.1 - 2.0	ml	Probelösung mit 3 - 30 µg Sulfit/Küvette
1.9 - 0	ml	bidestilliertes Wasser
0.01	ml	Suspension 3
0.05	ml	Suspension 4

Durchführung:

Die Bestimmung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Reagenzien:

Reaktionsgemisch 2:	0.4 mg NADH in 1 ml Triäthanolamin-Puffer (pH 8.0) gelöst
Suspension 3:	NADH-Peroxidase, Stabilisatoren
Suspension 4:	SO_2-Oxidase, Stabilisatoren

2.6.7 Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Nukleotiden, Sulfat und Sulfit

Der zu untersuchende Extrakt (0.01 ml) wurde zusammen mit den Referenzverbindungen auf Dünnschichtchromatographie-Platten (Fertigplatten mit Kieselgel 60 F_{254}, 20 x 20 cm, Fa. Merck) aufgetragen. Nach Trocknen der Probeflecke mit dem Fön wurde die Platte in eine Chromatographiekammer (Fa. Camag, Berlin) gestellt, die mit 100 ml eines Lösungsmittelgemisches aus Iso-Propanol/ Ammoniak (33%) / Wasser im Verhältnis 6:3:1 gefüllt worden war.

Nach der Beendigung des Laufs wurden die Platten mit dem Fön getrocknet und mittels verschiedener Methoden ausgewertet. Durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 254 nm konnten die Nukleotide identifiziert werden. Sulfat wurde durch ein Sprühreagenz (vgl. 2.6.9.2) nachgewiesen und die Verteilung der Radioaktivität durch Scannen der Platte verfolgt.

Die Referenzverbindungen lagen als 1 mM-Lösungen vor. Sowohl für die Herstellung des Extrakts als auch für die Lösung der Referenzverbindungen fand Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8.0) Verwendung. Dies war notwendig, da sich herausstellte, daß die R_f-Werte in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Puffers stark schwankten. Das von MITCHELL und WARING (1978) eingesetzte Laufmittel zur Identifizierung von Sulfat und Sulfit (Chloroform/ Methanol, 9:1) war für die hier verwendeten Dünnschichtplatten nicht geeignet, da alle untersuchten Verbindungen am Startfleck verblieben. Unter den beschriebenen Bedingungen zeigten Sulfat und Sulfit gleiche Laufeigenschaften. Eine Unterscheidung der beiden Substanzen erfolgte daher auf anderem Weg (vgl. 2.10.3).

2.6.8 Analytische Hochspannungselektrophorese

Die hochspannungselektrophoretische Trennung von Nukleotiden und Sulfat erfolgte mit einem Gerät der Fa. Camag, Berlin.
Das Elektrophoresepapier (2043B, Fa. Schleicher & Schüll, 20 x 40 cm) und die Stromübertragungsstreifen (Fa. Camag, Berlin) wurden in 25 mM Citratpuffer (pH 5.8) getränkt und mit einem Nudelholz so trocken wie möglich ausgepreßt. Das zuvor mit einem Bleistift markierte Elektrophoresepapier wurde auf die wassergekühlte Glasplatte aufgelegt. Nach dem Auftragen der Proben und der Referenzverbindungen (0.01 ml) wurden die Puffertröge an den Polen der Elektrophoresezelle mit 40 ml Laufpuffer (s.o., 25 mM Citrat-Puffer, pH 5.8) gefüllt und anschließend Stromübertragungsstreifen, Teflonfolie, Luftsack und Glasplatte nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers aufgelegt. Die Laufzeit betrug 15 Minuten bei 4000 Volt. Danach erfolgte die Trocknung des Elektrophoresepapiers bei 50°C für 30 Minuten im Trockenschrank. Die Adenylate waren unter einer UV-Lampe bei 254 nm als violette Flecke zu erkennen. Zur quantitativen Analyse der radioaktiven Verbindungen wurde das Elektrophoresepapier in 4 cm breite Bahnen geschnitten, die wiederum in 0.5 cm schmale Streifen unterteilt waren. Extrahiert wurde mit 0.5 ml Wasser über einen Zeitraum von 12 Stunden. Die Auszählung der Proben erfolgte wie unter 2.13.1 beschrieben.

2.6.9 Sulfat-Bestimmung

2.6.9.1 Sulfat-Bestimmung nach DODGSON (1961)

Bestimmungsansatz:

0.2 ml Probe mit 0 - 0.4 µmol $SO_4^{=}$
0.6 ml 4% Trichloressigsäure
0.2 ml $BaCl_2$-Gelatine-Reagenz

Durchführung:

Die Probe wurde in ein Zentrifugenglas pipettiert und mit Trichloressigsäure und dem Reagenz versetzt. Nach 20 Minuten bei Zimmertemperatur erfolgte die Extinktionsmessung bei 360 nm gegen einen Reagenzienleerwert. Vor der Messung wurden die Proben nochmals gut gemischt.

$BaCl_2$-Gelatine-Reagenz:

0.5 g Gelatine wurde in 100 ml bidestilliertem Wasser bei 70°C gelöst. Die Lösung wurde über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen. Anschließend wurde 0.5 g festes $BaCl_2 \times 2\ H_2O$ eingewogen und das Reagenz nach gründlichem Durchmischen noch 3 - 4 Stunden im Kühlschrank gelagert. Es konnte mehrere Tage verwendet werden, wenn täglich eine neue Eichkurve erstellt wurde.

2.6.9.2 Nachweis von Sulfat auf Dünnschichtchromatographie-Platten

Um Sulfat auf Dünnschichtchromatographie-Platten (vgl. 2.6.7) nachzuweisen, fand ein Sprühreagenz nach MITCHELL und WARING (1978) Verwendung.

Reagenzien:

Reagenz A: 3.0 g $BaCl_2$ und 0.6 g $KMnO_4$ in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst

Reagenz B: 9.7 M HCl

Durchführung:

Die getrockneten Chromatographieplatten wurden zunächst mit Reagenz A, anschließend mit Reagenz B besprüht. Das erste Reagenz bewirkte eine Rotfärbung der ganzen Platte, die durch das HCl-Spray wieder verschwand. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 120°C konnte das Sulfat-Ion als hellroter Fleck auf bräunlichem Hintergrund identifiziert werden.

Im Gegensatz zu den von MITCHELL und WARING (1978) erzielten Ergebnissen lag bei dem hier verwendeten System (vgl. 2.6.7) die untere Nachweisgrenze für Sulfat bei 2 µg.
Eine Unterscheidung zwischen Sulfat und Sulfit war unter diesen Bedingungen nicht möglich, da beide Substanzen die gleiche Farbreaktion zeigten.

2.7 Transportuntersuchungen

2.7.1 Sulfataufnahme

Bei der Messung der Sulfataufnahme wurde die Membranfiltertechnik verwendet, um die intrazelluläre Konzentration an radioaktiv markiertem Sulfat zu bestimmen.
Die Hefezellen wurden nach 3 Tagen geerntet, zweimal mit Inkubationsmedium (anaerobem Medium ohne Sulfat, 1:2 mit Wasser verdünnt) gewaschen und in frischem Inkubationsmedium suspendiert. Die Inkubationsdauer ohne Schwefelquelle lag bei 3 (Stamm 27), 3.5 (Stamm 2) bzw. 4.5 Stunden (Stamm 36).

Der Reaktionsansatz zur Messung der Sulfataufnahme enthielt in einem 10 ml Zentrifugenröhrchen:

0.01 - 0.25 ml	einer 10 mM Na_2SO_4-Stammlösung, d.h. die Sulfatkonzentration im Testansatz betrug bis zu 0.5 mM Sulfat; wenn nicht anders angegeben, wurde eine Sulfatkonzentration von 0.05 mM im Testansatz verwendet
0.01 ml	$^{35}SO_4^{=}$ als wässrige Lösung von Na_2SO_4, 5-10 µCi
2.48 - 2.23 ml	Inkubationsmedium: Zur Messung des Einflusses von Sulfit auf die Sulfataufnahme wurde das Volumen des Inkubationsmediums verringert, um 0.1 - 1.0 mM Sulfit (als festes Na_2SO_3 gelöst in bidestilliertem Wasser) kurz vor dem Start der Reaktion zuzugeben. In jedem Fall wurde der Reaktionsansatz mit Inkubationsmedium auf 2.5 ml aufgefüllt.

Der Start der Reaktion erfolgte mit 2.5 ml der ohne Schwefelquelle inkubierten Zellsuspension, die zuvor zentrifugiert und in 2.5 ml frischen Inkubationsmediums erneut aufgenommen worden war. Ein kleiner Magnetstab diente zur Durchmischung des Reaktionsansatzes.
In einigen Fällen waren mehr als 5 ml Zellsuspension pro Testansatz erforderlich. Dann wurde der obige Reaktionsansatz entsprechend auf 10 - 20 ml vergrößert.
Je 1 ml des Testansatzes wurde zum Zeitpunkt t_o (10 Sekunden nach dem Start der Reaktion) und dann jeweils im Abstand von einer Minute durch Membranfilter (Fa. Sartorius GmbH, Göttingen) mit der Porengröße 0.45 µm und einem Durchmesser von 25 mm gesaugt und anschließend mit 1 ml eiskalten Wassers gewaschen, um Reste des Inkubationsmediums zu entfernen. Mit Hilfe eines Filtrationsgerätes der Fa. Millipore konnten 12 Proben in kurzen Abständen genommen werden.
Zur Bestimmung der intrazellulären Radioaktivität wurden die Membranfilter wie unter 2.13.1 beschrieben weiter behandelt. Außerdem wurde anhand des Testvolumens von 0.5 ml des Reaktionsansatzes (s.o.) die Gesamtradioaktivität des Testansatzes für jeden Meßpunkt bestimmt.
Um die einzelnen Meßpunkte möglichst einheitlich zu behandeln, wurde die erste Probe (t_o) immer 10 Sekunden nach dem Start der Reaktion filtriert. Es zeigte sich bei allen Messungen, daß dieser Meßwert vergleichsweise sehr hoch lag. Dies ist auf an den Zellen haftendes Sulfat zurückzuführen. Um nur das tatsächlich aufgenommene Sulfat zu erfassen, wurde für die Ermittlung der spezifischen Aktivität immer die Differenz t_1-t_o bestimmt (t_1 = Sulfataufnahme nach 70 Sekunden). Die spezifische Aktivität des Sulfat-Transportsystems wurde definiert als nmol Sulfat/Min. x mg TG.

Für die Untersuchungen zum Einfluß der verschiedenen molekularen Formen des Sulfits auf die Sulfataufnahme erfolgte die Vorbereitung der Zellen unter Standardbedingungen. 30 ml einer Hefesuspension wurden geerntet, gewaschen, im gleichen Volumen des

Reaktionsmediums aufgenommen und ohne Schwefelquelle inkubiert. Anschließend wurden für jeden Meßpunkt 2.5 ml der ohne Schwefel inkubierten Zellsuspension zentrifugiert und der Überstand verworfen. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung des Reaktionsansatzes. Dazu wurden 25 ml des Inkubationsmediums, das zuvor auf den gewünschten pH-Wert eingestellt worden war, mit der entsprechenden Menge festen Natriumsulfits versetzt, der pH-Wert mit 1 N HCl korrigiert und 2.5 ml dieses Reaktionsmediums zusammen mit kaltem und radioaktiv markiertem Sulfat in Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach Aufnahme der zentrifugierten Zellen (s.o.) in 2.5 ml des Reaktionsmediums wurde die Reaktion durch Zugabe dieser Suspension zum Testansatz gestartet. Die Sulfataufnahme ohne Sulfit bei dem jeweiligen pH-Wert diente als Bezugspunkt.

2.7.2 Messung des Sulfit-Efflux durch Bestimmung der Sulfitkonzentration im Überstand

2.7.2.1 Einsatz von kaltem Sulfat

250 ml Zellsuspension wurden unter anaeroben Bedingungen kultiviert, nach 3 Tagen geerntet, zweimal mit Inkubationsmedium (anaerobes Medium ohne Schwefelquelle, 1:2 verdünnt) oder mit Puffer (50 mM Na-Citrat, pH 5.0) gewaschen, anschließend in 2 x 60 ml des gleichen Mediums suspendiert und auf zwei Erlenmeyerkolben verteilt. Die Sulfitbestimmung im Überstand erfolgte aus den erläuterten Gründen (vgl. 3.2.1.4), nach der Methode von PAUL (1958).
Zur Klärung der verschiedenen Fragestellungen wurde diese Versuchsdurchführung entsprechend variiert:

Für den Wachstumsversuch (vgl. 3.2.1.3) wurde eine 1l-Kultur unter Standardbedingungen anaerob inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden je 300 ml geerntet, zweimal mit 50 mM Na-Citrat-Puffer (pH 5.0) gewaschen und in 70 ml des gleichen Puf-

fers aufgenommen. Diese Suspensionen, verteilt auf zwei Erlenmeyerkolben, dienten zur Messung des Sulfit-Efflux. Die Probennahme erfolgte zu Beginn des Versuchs, nach 3 und nach 6 Stunden.

Für die Untersuchung der Ladungskompensation (vgl. 3.2.8) fanden Kulturen (250 ml) Verwendung, die in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet worden waren. Für diesen Versuch wurden die verwendeten Gefäße sorgfältig mit bidestilliertem Wasser gereinigt. Die geernteten Zellen wurden zweimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und auch in Wasser (2 x 70 ml) suspendiert. Die Probennahme (je 15 ml) erfolgte zu Beginn des Versuchs sowie nach 1.5, 2.5 und 3.5 Stunden. Nach der Zentrifugation der Proben dienten 10 ml der Sulfitbestimmung, 5 ml wurden für die Kationenbestimmung eingefroren. Das Sediment fand für die TG-Bestimmung Verwendung. Jede Meßreihe in Tab. 9, 10 und 11 stellt den Mittelwert aus 5 - 10 unabhängigen Messungen dar.

Um den Einfluß von Methionin und Cystein zu untersuchen (vgl. 3.2.3), erfolgte die Vorbereitung der Zellen unter Standardbedingungen. 500 ml Zellkultur wurden nach dem Waschen in dem halben Volumen Inkubationsmedium aufgenommen, auf 4 Erlenmeyerkolben verteilt und mit der entsprechenden Schwefelquelle (1.5 mM) versetzt. Die Kontrolle enthielt keinen Schwefel.

2.7.2.2 Einsatz von radioaktiv markiertem Sulfat

Nach 3 Tagen wurden die mit $^{35}SO_4^{=}$ gewachsenen Zellen (vgl. 2.4.4) geerntet, zweimal gewaschen, in 45 ml Na-Citrat-Puffer (50 mM, pH 5.0) suspendiert und zu je 7.5 ml auf 10-ml-Zentrifugenröhrchen verteilt. Die Reaktionsansätze enthielten 3 - 4 mg TG/ml Suspension und wurden mit kleinen Magnetstäbchen durchmischt. Sollte der Einfluß bestimmter Effektoren auf den Efflux untersucht werden, wurden diese in gelöster Form zugegeben. Die Kontrolle enthielt dann die entsprechende Menge des Lösungsmittels (demineralisiertes Wasser oder Äthanol).

Die Probennahme erfolgte zum angegebenen Zeitpunkt. Dazu wurden 0.6 ml der Zellsuspension in 1.5 ml-Reaktionsgefäße mit Deckel pipettiert und 30 Sekunden bei 15000 UpM (Mikrofuge, Fa. Beckmann) zentrifugiert. 0.5 ml des Überstands dienten zur Messung der extrazellulären Radioaktivität (vgl. 2.13.1).

Alle Untersuchungen zum Sulfit-Efflux mit radioaktiv markiertem Sulfit wurden unter dem Abzug durchgeführt.

2.7.3 Messung des Sulfit-Efflux durch Bestimmung der intrazellulären Radioaktivität

160 ml der unter Standardbedingungen kultivierten Zellsuspension (vgl. 2.4.4) wurden geerntet, zweimal mit dem gewünschten Puffer gewaschen und in 20 ml des gleichen Puffers aufgenommen. Für den pH-Bereich von 3 - 6 fand 50 mM Na-Citrat-Puffer, für pH 7 Tris-HCl-Puffer (50 mM) Verwendung.
Zu Beginn des Versuchs sowie nach 4.5 und nach 24 Stunden wurden für jeden pH-Wert 3 x 0.5 ml Suspension filtriert (Durchführung wie bei den Untersuchungen zur Sulfataufnahme) und die Radioaktivität der Filter wie unter 2.13.1 beschrieben bestimmt. Parallel dazu erfolgte auch die Messung der Zunahme der Radioaktivität im Überstand.

2.8 Untersuchungen mit Transportinhibitoren

DNP, CCCP, DES und DCCD wurden in Äthanol, Nystatin in 1,3-Propandiol gelöst und zum angegebenen Zeitpunkt in den Reaktionsansatz (vgl. 2.7.2.2) pipettiert. Die Kontrolle enthielt das entsprechende Volumen Äthanol bzw. 1,3-Propandiol.

2.9 Bestimmung der intrazellulären Sulfitkonzentration

2.9.1 Zentrifugation in ein spezifisch dichteres Medium

Vorversuche hatten gezeigt, daß bei jedem Waschvorgang die gleiche Menge Sulfit aus den Zellen extrahiert wurde. Um einen möglichen Verlust an intrazellulärem Sulfit zu verhindern, wurden die Zellen stattdessen in ein spezifisch dichteres Medium zentrifugiert.
Da zur Bestimmung der intrazellulären Sulfitkonzentration große Zellmengen erforderlich waren, mußte zunächst das Volumen der Kultur verringert werden. Dies geschah durch Zentrifugation (Sorvall RC 2B bzw. Cryofuge, Fa. Heraeus Christ; 10000 UpM) der Zellen und anschließende Aufnahme in einigen Millilitern des Überstandes. Mit dieser dichten Zellsuspension wurden Glycerinlösungen unterschiedlicher Konzentration (10 - 50%) überschichtet. Es zeigte sich, daß eine 30%ige Glycerinlösung die günstigsten Eigenschaften aufwies, d.h., daß die Zellsuspension zügig auf die Glycerinlösung pipettiert werden konnte, ohne daß zuviel Zellmaterial in diese gelangte.
Anschließend wurden die zwei Phasen kurz hochtourig zentrifugiert (2 Minuten bei 15000 UpM), der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Zellen in einigen Millilitern bidestillierten Wassers aufgenommen, das zuvor mit Sauerstoff-freiem Stickstoff (vgl. 2.14) begast worden war.

2.9.2 Permeabilisierung der Zellen durch Nystatin

2.9.2.1 Vergleich der durch Kochen bzw. der durch Nystatinzugabe extrahierten Phosphatmenge

90 ml Hefesuspension (Anzucht vgl. 2.4.2) wurden geerntet und in 9 ml des Überstands erneut aufgenommen. Nach der daran anschließenden Zentrifugation in ein spezifisch dichteres Medium (20 ml einer 30%igen Glycerinlösung) wurde das Sediment in 7.5 ml

demineralisierten Wassers aufgenommen und zu je 2.5 ml auf 3 Zentrifugenröhrchen verteilt. Der Inhalt der Röhrchen erfuhr jeweils eine andere Behandlung. Ein Teil wurde 20 Minuten gekocht, der 2. Teil mit 0.1 mM Nystatin (gelöst in 1,3-Propandiol) versetzt und der dritte Teil ohne Zusatz inkubiert. Alle Reaktionsansätze umfaßten das gleiche Volumen durch Ergänzung der Suspensionen ohne Nystatin mit der entsprechenden Menge 1,3-Propandiol.
In Abständen von 30 Minuten wurde jeweils eine Probe von 0.4 ml zentrifugiert und 0.25 ml des klaren Überstands in den Phosphattest eingesetzt.

2.9.2.2 Permeabilisierung der Zellen mit Nystatin zur Bestimmung der intrazellulären Sulfitkonzentration

Zur Durchführung des Hauptversuchs wurden die Zellen 10 - 12 Tage unter aeroben Bedingungen mit 10% Glycerin als Kohlenstoffquelle (pH 4) inkubiert.
Um die geringe Menge intrazellulären Sulfits zu bestimmen, waren jeweils mindestens 1.6 Liter Zellkultur notwendig (vgl. 2.4.3). Diese wurden geerntet und in 10 ml des Überstands resuspendiert. Die dabei entstehende sehr dichte Zellsuspension wurde zu gleichen Teilen auf 6 Zentrifugenröhrchen verteilt, die je 25 ml einer 30%igen Glycerinlösung enthielten. Diese Verteilung ermöglichte eine saubere Trennung der beiden Phasen.
Nach der Zentrifugation (2 Minuten bei 15000 UpM) und dem Absaugen des Überstands mit einer Wasserstrahlpumpe wurden die Zellsedimente in 15 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen, das zuvor mit Sauerstoff-freiem Stickstoff begast worden war (vgl. 2.14). Es ergab sich ein Gesamtvolumen von 22 ml. Die Suspension wurde anschließend mit 0.22 ml einer 10 mM Nystatinlösung (gelöst in 1,3-Propandiol) versetzt, so daß die Endkonzentration 0.1 mM Nystatin betrug, und 2.5 Stunden unter Stickstoffbegasung inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (2 x 10 Minuten bei 15000 UpM) abgetrennt, das Sediment 1 x gewaschen, die Überstände vereinigt und zur Sulfitbestimmung nach PAUL (1958) verwendet. Die Zentrifugation fand in verschlossenen Zentrifugenröhrchen, der Waschvorgang unter Stickstoffbegasung statt, um eine Sulfitoxidation während des Präparationsvorgangs zu verhindern. Zur Auswertung der Meßergebnisse wurde ein Zellvolumen von 3.1 µl/mg TG (GANCEDO und GANCEDO, 1973) zugrunde gelegt. Die Ergebnisse in Tab. 7 stellen die Mittelwerte aus 7 unabhängigen Meßreihen dar.

2.10 Radioaktive Markierung der intrazellulären Schwefelverbindungen

2.10.1 Einsatz einer radioaktiven Schwefelquelle

Um die Substanz zu identifizieren, die einen 24-stündigen Efflux ermöglicht, wurden die gleichen Anzuchtbedingungen gewählt wie bei der Messung des Sulfit-Efflux.
50 ml Hefesuspension wurden mit 10 µCi $^{35}SO_4^{=}$ versetzt (vgl. 2.4.4), nach 3 Tagen geerntet (insgesamt 200 mg TG), in 1 ml des Überstands resuspendiert und in eine 30%ige Glycerinlösung zentrifugiert (vgl. 2.9.1).

2.10.2 Extraktion der intrazellulären Verbindungen

Die Extraktion erfolgte sowohl für den sulfitbildenden Stamm 36 als auch für den Normalstamm V 102515 in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8.0) mit 0.1 mM Nystatin unter anaeroben Bedingungen durch Begasen mit Stickstoff (vgl. 2.9.2.2).
Die Zellen wurden in 0.1 ml des Extraktionspuffers (50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8.0 mit 0.1 mM Nystatin) aufgenommen, 2 - 3 Stunden unter Rühren inkubiert, anschließend durch Zentrifugation

abgetrennt und erneut extrahiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis der Überstand nicht mehr klar war, d.h. bis die Zellen völlig zerstört waren. Das war in der Regel nach Extraktion über Nacht der Fall.
Die Überstände der verschiedenen Extraktionsvorgänge wurden im Eis unter Stickstoff aufbewahrt und anschließend vereinigt. Es ergab sich eine Extraktmenge von 0.5 ml.
Zum Vergleich der beiden Stämme wurde die gleiche Menge Zellmaterial (200 mg TG) zugrunde gelegt.

2.10.3 Fraktionierung und Chromatographie der radioaktiven Extrakte

Ein Teil der radioaktiven Extrakte wurde 90 Sekunden gekocht und anschließend zentrifugiert, um einen klaren Überstand zu erhalten. 10 µl des Überstandes dienten der Fraktionierung durch Dünnschichtchromatographie (vgl. 2.6.7) und Hochspannungselektrophorese (vgl. 2.6.8).
Durch das Kochen wurde das vorhandene Sulfit zu Sulfat oxidiert. Zudem war es nicht möglich, mit den verwendeten Methoden zwischen Sulfat und Sulfit zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurde ein Teil des Extrakts nicht gekocht, sondern in Lips-Conway-Schalen mit Säure versetzt (vgl. 2.6.5), um das vorhandene Sulfit als SO_2 zu bestimmen.

2.11 Spektrometrische Bestimmung von Na^+- und K^+-Ionen

Die quantitative Bestimmung der Na^+- und K^+-Ionen erfolgte in einem Atom-Absorptions-Spektrophotometer (Modell 360) der Fa. Perkin-Elmer & Co. GmbH, Überlingen). Bei der Messung der Na^+-Konzentration wurden die Proben (vgl. 2.7.2.1) unverdünnt verwendet, im Fall der K^+-Ionen war eine Verdünnung im Verhältnis 1 : 5 mit bidestilliertem Wasser erforderlich.

Als Eichlösungen dienten 50 µM und 100 µM NaCl- und KCl-Lösungen. Alle Ionenbestimmungen wurden wurden in 5- bis 10-facher Ausführung vorgenommen.

2.12 Phosphatbestimmung nach TAUSSKY und SHORR (1953)

Bestimmungsansatz:

0.5 ml Probe mit bis zu 0.35 µmol Phosphat
0.5 ml 10% Trichloressigsäure
0.5 ml Taussky-Shorr-Reagenz

Durchführung:

Die Proben wurden mit Trichloressigsäure und dem Reagenz versetzt und vermischt. Nach frühestens 4 Minuten erfolgte die Extinktionsmessung bei 578 nm gegen einen Reagenzienleerwert. Die Eichkurve wurde mit KH_2PO_4 erstellt.
Alle verwendeten Gefäße waren zuvor mit verdünnter Salzsäure und danach mit bidestilliertem Wasser gespült worden, um am Glas haftendes Phosphat zu entfernen.

Taussky-Shorr-Reagenz:

Lösung A: 50 g $(NH_4)_6MoO_{24}$ x 4 H_2O wurden in 400 ml 10 N H_2SO_4 gelöst; es wurde dann mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt; diese Lösung war haltbar, wenn sie in einer dunklen Flasche aufbewahrt wurde.

Lösung B: 2.5 g $Fe(II)SO_4$ x 7 H_2O wurden in 10 ml Lösung A gelöst und anschließend mit bidestilliertem Wasser auf 50 ml ergänzt. Diese Lösung (Taussky-Shorr-Reagenz) wurde in einer braunen Flasche aufbewahrt und täglich frisch angesetzt.

2.13 Radioaktivitätsmessung

2.13.1 Flüssigkeitsszintillationszähler

Zur Bestimmung der Radioaktivität gelöster Stoffe diente ein Flüssigkeitsszintillationszähler (LS 230) der Fa. Beckmann, München.
0.5 ml der zu messenden Probe wurden in Plastikszintillationsgefäße (Fa. Baker, Gross-Gerau) pipettiert und mit 5 ml des Szintillators (Lumagel, Fa. Baker) versetzt. Vor der Messung wurden die Proben über Nacht im Dunkeln gelagert.
Bei der Filtrationstechnik (vgl. 2.7.1) wurden die Filter ohne weitere Vorbehandlung in die Plastikszintillationsgefäße gegeben, mit 5 ml Lumagel überschichtet und 12 Stunden später gemessen.
Der Szintillationszähler wurde so eingestellt, daß der statistische Zählfehler in 95% aller Fälle kleiner als 1% war.
Alle radioaktiven Proben, deren Zählung das gleiche Kanalverhältnis ergab, konnten ohne Korrektur miteinander in Beziehung gesetzt werden.
Beim Vergleich von gefärbten und ungefärbten Proben, z.B. beim Einsatz von DNP oder $CrO_4^{=}$, mußten die Zählergebnisse um den Quenchfaktor korrigiert werden. Dieser wurde aus einer zu diesem Zweck erstellten Quenchkurve entnommen.

2.13.2 Messung der Radioaktivität auf Chromatographieplatten und Elektrophoresepapier

Die Radioaktivität auf Chromatographieplatten und Elektrophoresepapier wurde mit dem Dünnschichtscanner II der Fa. Berthold (LB 2723) lokalisiert und mit Blaupapier auf Papier aufgezeichnet.
Die Blende am Zählrohr hatte die Abmessung 10 mm x 1 mm. Der Dünnschichtscanner wurde auf einen Vorschub von 300 mm/Stunde, den Meßbereich 10 und die Zeitkonstante 10 eingestellt.

2.14 Entfernen von Sauerstoff aus Gasen durch einen Kupferkatalysator

Die mit einem Glasmantel umgebene Kupfersäule stammte von der Fa. P. Ochs, Bovenden.
Vor der Benutzung war der Katalysator durch Erhitzen und Durchleiten von Wasserstoff vollständig zu reduzieren (Schwarzfärbung des Katalysators). Die Oxidation wurde durch erneute Farbveränderung (rötlich) sichtbar.
15 Minuten vor der Anwendung mußte der Katalysator eingeschaltet werden, damit er die Betriebstemperatur von ca. 150°C erreichte. Das zu reinigende Gas wurde anschließend über den Katalysator geleitet.

2.15 Herkunft der Chemikalien

Amersham-Buchler, Braunschweig:	$^{35}SO_4^{=}$
Baker Chemicals, Gross-Gerau:	Lumagel Szintillator
Boehringer, Mannheim:	Biochemikalien und Sulfit-Test
Difco, Detroit (USA):	nachgereinigter Agar, Hefeextrakt
Merck, Darmstadt:	alle übrigen Chemikalien, Reinheitsgrad p.a.
Merck-Schuchardt, Hohenbrunn:	Propandiol -(1,3), N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
Serva, Heidelberg:	Rinderserumalbumin, Nystatin, 3,3', 4', 5-Tetrachlorsalycylanilid
Sigma, München:	Diethylstilböstrol, Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon, Selenat

Die Referenzverbindungen APS und PAPS wurden freundlicherweise von Frau Dr. U. Bias (APS) und Herrn Dr. J.F. Imhoff (PAPS) zur Verfügung gestellt.

3. Experimente und Ergebnisse

3.1 Wird Sulfit über den Sulfat-Träger transportiert?

3.1.1 Charakterisierung des Sulfat-Transportsystems

Die Sulfataufnahme bei Hefen ist durch Substratanaloga wie z.B. Chromat, Selenat, Molybdat oder Thiosulfat hemmbar (KLEINZELLER et al., 1959; MAW, 1963 a). In einigen Fällen (KOTYK, 1959; McCREADY und DIN, 1974) konnte eine Hemmung der Sulfataufnahme auch durch das Analogon Sulfit festgestellt werden.

Bei anderen Pilzen wurde gezeigt, daß einige Sulfatanaloga durch das Sulfat-Transportsystem aufgenommen werden (TWEEDIE und SEGEL, 1970; McKILLEN und SPENCER, 1970; ROBERTS und MARZLUF, 1971).

Aufgrund dieser Beobachtungen wies HEINZEL (1978) auf die Möglichkeit einer Sulfitausscheidung über den Sulfat-Träger hin. Dieser Hinweis sollte in den folgenden Untersuchungen überprüft werden.
Zunächst war es erforderlich, die günstigsten Bedingungen für die Messung der Sulfataufnahme zu ermitteln, um anschließend den Einfluß des Substrat-Analogons Sulfit zu untersuchen.

3.1.1.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Sulfataufnahme

Die Geschwindigkeit der Sulfataufnahme ist in dem gewählten Konzentrationsbereich von der eingesetzten Sulfatmenge abhängig und verläuft nur in den ersten zwei Minuten linear (Abb. 3). Dieser Zeitraum diente zur Bestimmung der Aktivität des Sulfat-Transportsystems (vgl. 2.7.1).

In allen Fällen (Abb. 3) gehen die Geraden nicht durch den Nullpunkt; der erste, relativ hohe Meßwert ist durch Adsorption an die Zellwände bedingt. McCREADY und DIN (1974) beobachteten bei anderen Stämmen der Art Saccharomyces cerevisiae, SPEDDING et

al. (1980b) bei Chlorella vulgaris und BRADFIELD et al. (1970) und YAMAMOTO und SEGEL (1966) bei Aspergillus und Penicillium das gleiche Phänomen. Die relativ hohe Radioaktivität zum Zeitpunkt Null ist pH-abhängig und wird nicht durch niedrige Temperaturen oder Zellgifte (DNP) beeinflußt (YAMAMOTO und SEGEL, 1966).

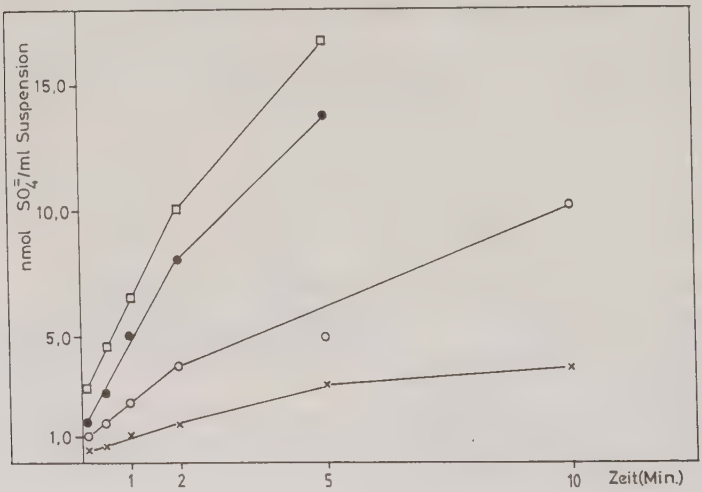

Abb. 3: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Sulfataufnahme

Sulfatkonzentrationen:
x 0.01 mM; o 0.025 mM; • 0.05 mM; □ 0.1 mM.

5 ml der Hauptkultur (Stamm 36) wurden zweimal mit Inkubationsmedium (vgl. 2.7.1) gewaschen, in 25 ml desselben Mediums aufgenommen und 4.5 Stunden bei 25°C inkubiert. Die optische Dichte der Kultur bei 600 nm betrug 3.45. Die Testansätze für die Messung der Sulfataufnahme umfaßten 10 ml. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde je 1 ml durch Membranfilter gesaugt und die intrazelluläre Radioaktivität bestimmt (vgl. 2.7.1 und 2.13.1).

Diese Beobachtungen sprechen eher für Adsorption als für Transport. Den gemessenen Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration erklären die Autoren durch Adsorption des Sulfats an positiv geladene Gruppen der Zelloberfläche.

Durch häufiges Waschen der Zellen ließ sich in einigen Fällen das adsorbierte Sulfat entfernen (YAMAMOTO und SEGEL, 1966). Bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war dies - aus meßtechnischen Gründen - nicht möglich und wurde daher bei der Bestimmung des tatsächlich aufgenommenen Sulfats berücksichtigt (vgl. 2.7.1).
Die hier beobachtete Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit trifft auch für die Stämme 27 (Sulfitbildner) und 2 (Normalstamm) der Art Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus zu (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.1.1.2 Abhängigkeit von der Inkubationsdauer ohne Schwefelquelle

Es ist charakteristisch für das Sulfat-Transportsystem der Hefen, daß die Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme davon abhängt, wie lange die Zellen ohne externe Schwefelquelle inkubiert worden sind (KLEINZELLER et al., 1959; ROOMANS et al., 1979). Auch bei den hier untersuchten Hefen erhöhte sich die Sulfataufnahme mit zunehmender Inkubationsdauer ohne Schwefelquelle je nach Stamm um das 5- bis 16-fache (Abb. 4).

In den folgenden Versuchen wurden daher die Hefesuspensionen vor der Messung der Sulfataufnahme solange ohne Schwefelquelle inkubiert, bis das Maximum der Aufnahme erreicht war. Wie aus der Abb. 4 hervorgeht, dauerte dies 280 (Stamm 36), 180 (Stamm 27) bzw. 210 Minuten (Stamm 2).
Während der Schwefelaushungerungsperiode nahm das Trockengewicht der Hefesuspensionen um 25% bis 33% zu.

Eine Steigerung der Sulfataufnahme wurde jedoch nur unter bestimmten Inkubations-Bedingungen festgestellt. Nach einer Aushungerungsperiode in Wasser oder Puffer war kein Sulfat-Transport mehr meßbar.
Wurde jedoch stattdessen ein Ammonium-Phosphat-Puffer mit Glucose verwendet, entsprach die Aufnahme derjenigen der Standardbedingungen.

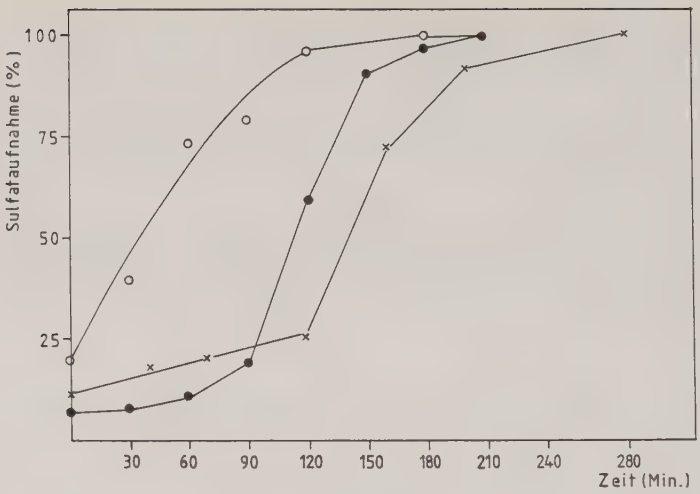

Abb. 4: Anfangsgeschwindigkeit der Sulfataufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer ohne Schwefelquelle

x Stamm 36; o Stamm 27; • Stamm 2; 100% entspricht der maximalen Anfangsgeschwindigkeit des jeweiligen Stammes.

Die Anzucht und Vorbereitung der Zellsuspension erfolgte wie in der Legende zu Abb. 3 beschrieben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mit je 2.5 ml der Zellsuspension die Anfangsgeschwindigkeit der Sulfataufnahme bestimmt (vgl. 2.7.1).

3.1.1.3 Abhängigkeit der Sulfataufnahme von der Zusammensetzung des Reaktionsmediums

Ziel der Untersuchungen zum Sulfat-Transport war es, den Einfluß von Sulfit auf die Sulfat-Aufnahme zu charakterisieren. Um zu verhindern, daß Sulfit mit den Komponenten des Mediums Reaktionen eingeht (z.B. Addition an die im Medium enthaltene Glucose), wurde versucht, das komplette Medium durch Wasser oder Puffer zu ersetzen.

Schon die ersten Untersuchungen zur Messung der Sulfataufnahme hatten gezeigt, daß es sich bei allen Organismen um einen energieabhängigen Prozeß handelt. Daher konnte in den meisten Fällen der Transport nur in Gegenwart einer Energiequelle gemessen werden. Bei einigen Organismen allerdings, wie z.B. Aspergillus nidulans und Penicillium notatum (BRADFIELD et al., 1970; CUPPOLOETTI und SEGEL, 1975) sowie Salmonella typhimurium (DREYFUSS, 1964) fand die Sulfataufnahme auch in Puffer oder Wasser ohne weitere Zusätze statt. In diesen Fällen waren die endogenen Energiereserven offensichtlich ausreichend, um über den gemessenen Zeitraum den Sulfat-Transport zu energetisieren.

Es stellte sich heraus, daß bei den hier untersuchten Hefestämmen in Wasser oder Puffer allein keine oder nur eine äußerst geringe intrazelluläre Radioaktivität (5% der Aufnahme in komplettem Medium) nachgewiesen werden konnte. Aufnahmeversuche in verdünntem Reaktionsmedium zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe (Tab. 1).

Tab. 1: Sulfataufnahme in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe des Reaktionsmediums

	nmol $SO_4^{=}$ / Min. x ml Suspension			
	Standardreaktionsansatz	Verdünnung 1 : 5	Verdünnung 1 : 10	Verdünnung 1 : 50
Stamm 27	4.70	2.15	0.92	0.32
Stamm 2	4.28	2.03	1.79	0.38

Die Zellen wurden wie unter 2.7.1 beschrieben, angezogen, gewaschen und erneut suspendiert (die optische Dichte der Kultur bei 600 nm betrug 1.0). Nach der Inkubation ohne Schwefelquelle erfolgte die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der Sulfataufnahme in verdünntem Reaktionsmedium.

Offensichtlich ist die Aufnahme von der Konzentration eines oder mehrerer Bestandteile des Reaktionsmediums abhängig. Um dies zu klären, wurde die Sulfataufnahme in Medium verschiedener Zusammensetzung getestet (Tab. 2).

Tab. 2: Sulfataufnahme in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Reaktionsmediums

Reaktionsmedium zur Messung der Sulfataufnahme	Zusätze zum Reaktionsmedium	Sulfataufnahme
komplettes Medium	keine	+
aqua demin.	keine	-
Na_2HPO_4/Citrat-Puffer, 50 mM; pH 5.0	keine	-
K-Phosphat-Puffer 50 mM; pH 5.0	keine	-
Citrat-Puffer, 50 mM; pH 5.0	keine	-
komplettes Medium ohne Glucose	keine	-
Na_2HPO_4/Citrat-Puffer 50 mM; pH 5.0	Glucose	-
Na_2HPO_4/Citrat-Puffer 50 mM; pH 5.0	Fructose	-
K-Phosphat-Puffer, 50 mM; pH 5.0	Glucose	-
K-Phosphat-Puffer, 50 mM; pH 5.0	Fructose	-
$(NH_4)_2HPO_4/KH_2PO_4$-Puffer, 30 mM; pH 5.0	Glucose	+

+ Sulfataufnahmerate in komplettem Medium;
- keine oder nur geringe (5% der Aufnahmerate in komplettem Reaktionsansatz) Sulfataufnahme;
die Versuche wurden mit den beiden Sulfit bildenden Stämmen 27 und 36 durchgeführt;
die Glucose-Konzentration entspricht derjenigen des Wachstumsmediums (vgl. 2.2.2)

In komplettem Medium ohne Glucose war nur eine extrem geringe Aufnahmerate zu verzeichnen. Sie betrug nur etwa 5% der Aufnahme im vollständigen Reaktionsansatz.
Da es sich bei der Sulfat-Aufnahme um einen energieabhängigen Prozeß handelt, liegt die Vermutung nahe, daß die Sulfataufnahme nur in Gegenwart einer externen Energiequelle erfolgen kann. Neben Glucose wurde auch Fructose getestet, da in diesem Fall eine geringere Sulfitbindung als bei Glucose nachgewiesen worden war (CARR et al., 1976).

Offensichtlich ist der Sulfat-Transport jedoch nicht nur von der Energiequelle im Reaktionsansatz abhängig. Dies ist daran zu erkennen, daß die Zugabe von Glucose bzw. Fructose zu Citrat- bzw. Phosphat-Puffer nicht zu einer meßbaren Sulfataufnahme führte.
Die Untersuchungen von KLEINZELLER et al. (1959), KOTYK (1959) und MAW (1963b) an Stämmen von Saccharomyces cerevisiae und von CROCOMO und MENARD (1962) an Torulopsis utilis hatten gezeigt, daß eine optimale Sulfataufnahme in Gegenwart von NH_4^+-Ionen oder anderen Stickstoffquellen (MAW, 1963b) erfolgt. Allerdings erwies sich die Stickstoffverbindung nicht als unbedingt notwendig. Auch ROOMANS und Mitarbeiter (1979) führten ihre Untersuchungen in Inkubationspuffer ohne NH_4^+-Ionen durch.

Durch sukzessives Weglassen je einer Komponente des Mediums konnte im vorliegenden Fall festgestellt werden, daß in einem Ammonium-Ionen und Glucose enthaltenden Phosphat-Puffer ein - im Vergleich zu komplettem Medium - unverminderter Sulfat-Transport zu messen ist. Vermutlich sind neben einer Energiequelle Ammonium-Ionen für die Sulfataufnahme erforderlich. Eine Untersuchung dieses Phänomens wurde nicht vorgenommen, da es für die hier zu klärende Frage keine Bedeutung hatte.

Die Versuchsreihen haben gezeigt, daß für die Messung der Sulfataufnahme auf Glucose nicht verzichtet werden kann. Für die weiteren Untersuchungen fand daher immer komplettes Medium Verwendung.

3.1.1.4 Einfluß des extrazellulären pH-Wertes

Zur Ermittlung der Standardbedingungen für die Messung der Sulfataufnahme und im Hinblick auf die Hemmexperimente mit Sulfit (vgl. 3.1.2.3) war es wichtig festzustellen, ob und in welchem Maße die Sulfataufnahme von der Wasserstoffionenkonzentration im Reaktionsansatz beeinflußt wird.

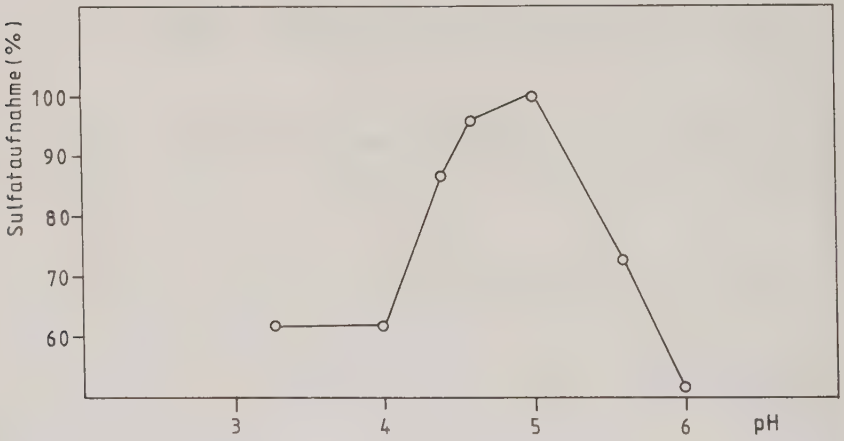

Abb. 5: pH-Optimum der Sulfataufnahme

Die Vorbereitung der Zellsuspension (Stamm 27) erfolgte unter Standardbedingungen (vgl. 2.7.1). Die optische Dichte der Kultur bei 600 nm vor Beginn der Aushungerungsperiode betrug 1.0.
Die Messung der Aufnahme fand in einem Reaktionsansatz mit dem gewünschten pH-Wert statt. Dazu wurden pro Testansatz 2.5 ml der ohne Schwefel inkubierten Zellsuspension kurz zentrifugiert und im Reaktionsmedium mit dem gewünschten pH-Wert resuspendiert. Die weitere Durchführung verlief wie unter 2.7.1 beschrieben.

Das Optimum der Sulfataufnahme liegt bei pH 5.0. Daher wurde dieser pH-Wert für die Messungen unter Standardbedingungen zugrunde gelegt.
Wie aus Abb. 5 hervorgeht, schwankt die Sulfat-Transportrate zwischen pH 4.0 und 5.8 um etwa 40%. Ähnlich liegen die Ergebnisse bei Stamm 36 (nicht dargestellt). Innerhalb dieses pH-Bereiches wurde in späteren Experimenten (vgl. 3.1.2.3) der

Einfluß der verschiedenen molekularen Formen des Sulfits auf die Sulfataufnahme untersucht (Ab. 8 und 9). Bei der Auswertung dieser Versuchsreihe mußte die pH-abhängige Schwankung der Transportrate berücksichtigt werden. Als Bezugspunkt (100%) für das Ausmaß der Sulfithemmung diente daher die ungehemmte Sulfataufnahme bei dem jeweiligen pH-Wert (vgl. 2.7.1).

3.1.2 Einfluß des Analogons Sulfit auf die Sulfataufnahme

Die folgenden Untersuchungen sollten klären, ob und in welcher molekularen Form Sulfit die Aufnahme des Sulfats beeinflußt. Dadurch könnten sich Hinweise auf einen gemeinsamen Transportweg der beiden Anionen ergeben. Dies wiederum läßt Rückschlüsse auf eine mögliche Ausscheidung des Sulfits über den Sulfatträger zu.

Tab. 3: Stabilität einer wässrigen Sulfitlösung

Inkubationsdauer (Min.)	µmol Sulfit / 0.02 ml		
	anaerob+ bei Zimmertemperatur	aerob bei 4°C	aerob bei Zimmertemperatur
0	0.2	0.2	0.2 (100%)
30	0.187	n.b.	0.163 (81.5%)
60	0.194	n.b.	0.134 (67.0%)
90	0.187	n.b.	0.060 (30.0%)
120	0.197	0.194	0.033 (16.5%)

+ Begasen der Lösung mit Sauerstoff-freiem Stickstoff (vgl. 2.14);
die Sulfitbestimmung erfolgte nach der Methode von WEST und GAEKE (1957).

Bei den Hemmexperimenten mit Sulfit fand immer eine frisch angesetzte Sulfitlösung Verwendung, die in Eis aufbewahrt und erst kurz vor Versuchsbeginn zugegeben wurde. Diese Vorsichtsmaßnahme war nötig, da Sulfit bei Zimmertemperatur unter aeroben Bedingungen zu Sulfat oxidiert (Tab. 3). Man erkennt, daß der Sulfitgehalt der Lösung unter diesen Voraussetzungen linear mit der Zeit abnimmt. Bei Stickstoffbegasung (vgl. auch 3.2.7.2) und im Eis bleibt der Sulfitgehalt über den gemessenen Zeitraum konstant.

3.1.2.1 Hemmung durch steigende Sulfitkonzentrationen

Die Sulfataufnahme wird durch Sulfit gehemmt (Abb. 6).

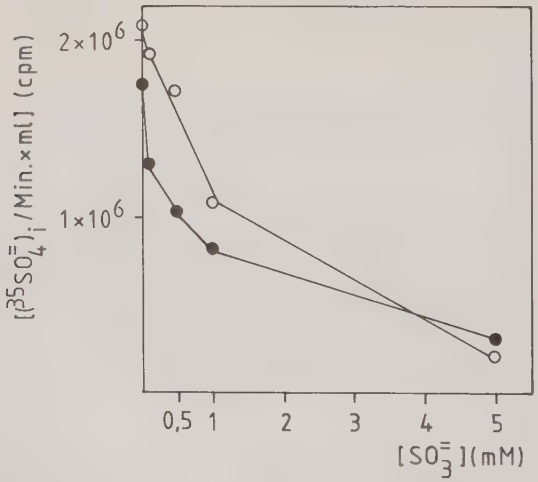

Abb. 6: Einfluß steigender Sulfitkonzentrationen auf die Sulfataufnahme

o Stamm 27; ● Stamm 2;

die Zellen wurden wie unter 2.7.1 beschrieben, angezogen, gewaschen und erneut suspendiert (die optische Dichte der Kultur bei 600 nm betrug 1.0). Nach der Inkubation ohne Schwefelquelle wurde die Aufnahme wie unter 2.7.1 beschrieben gemessen.

Das Transportsystem des Normalstammes erweist sich bei Konzentrationen < 1 mM als empfindlicher gegenüber Sulfit als der Sulfit-produzierende Stamm. Diese Beobachtung könnte für das Phänomen der Sulfitresistenz der sulfitbildenden Weinhefen (BAUMGARTEN, 1981) von Bedeutung sein (vgl. Diskussion 4.1).

3.1.2.2 Präinkubation mit Sulfit

Strukturell ähnliche Verbindungen, die durch denselben Träger aufgenommen werden, hemmen die Aufnahme des einen Substrats nach Präinkubation mit dem anderen (CUPPOLETTI und SEGEL, 1974). Dies Phänomen ist auf eine Transinhibition des Transportsystems zurückzuführen. Im Falle des Sulfat-Trägers wurde eine Hemmung durch intrazelluläre Substratanaloga, wie z.B. Selenat und Molybdat (CUPPOLETTI und SEGEL, 1974), Thiosulfat (YAMAMOTO und SEGEL, 1966) und Chromat (PASSERA und FERRARI, 1975) nachgewiesen. Daher sollte in einer Versuchsreihe festgestellt werden, ob auch Sulfit eine Transinhibition der Sulfataufnahme bewirkt. Experimentell läßt sich dies durch unterschiedlich lange Präinkubation mit dem Substrat-Analogon überprüfen.
Werden zwei Substrate durch denselben Träger transportiert, kann unter bestimmten Bedingungen auch eine Stimulation der Aufnahme (Transmembraneffekt, vgl. 3.2.2) nachgewiesen werden. Der Transmembraneffekt führt zu einer beschleunigten Aufnahme des einen Substrates nach Vorinkubation mit dem anderen. Auch dies Phänomen könnte nach Präinkubation mit Sulfit auftreten.

Die Inkubation der Zellen mit Sulfit vor Messung der Sulfat-Aufnahme (Abb. 7) führte zu einer ausgeprägten Hemmung des Transports. Schon eine 10-minütige Präinkubation brachte ihn sowohl im Falle des Normalstamms (2) als auch beim Sulfitbildner (27) fast vollständig zum Erliegen.

Dies Ergebnis, das auf ein gemeinsames Transportsystem für Sulfat und Sulfit hinzuweisen scheint, kann jedoch unter Berücksichtigung der Sulfit-Toxizität nicht eindeutig interpretiert werden (vgl. Diskussion 4.1).

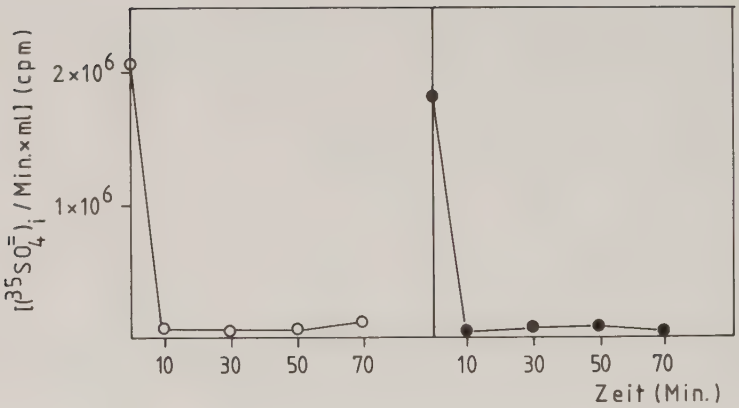

Abb. 7: Hemmung der Sulfataufnahme durch Präinkubation mit 1 mM Sulfit

o Stamm 27; • Stamm 2

Die gewaschenen Zellsuspensionen (optische Dichte bei 600 nm 1.0) wurden in schwefelfreiem Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Aufnahme in frischem Medium, das, den ersten Meßpunkt ausgenommen, 1 mM Sulfit enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 2.5 ml der Zellsuspension in frischem, schwefelfreiem Medium aufgenommen und die Anfangsgeschwindigkeit der Sulfataufnahme bestimmt. Während der Inkubationszeit mit Sulfit wurden anaerobe Bedingungen durch Begasen mit Stickstoff gewährleistet.

3.1.2.3 Einfluß der verschiedenen molekularen Formen des Sulfits auf die Sulfataufnahme

Sulfit liegt in Abhängigkeit vom pH-Wert in drei verschiedenen molekularen Formen vor (Abb. 1). Es sollte daher festgestellt werden, welche der drei Formen die Sulfat-Aufnahme hemmt.

Im Falle des $SO_3^{=}$-Anions als hemmende Species ist ein gemeinsamer Transportweg für die beiden Anionen (Sulfat und Sulfit) wahrscheinlicher, als im Falle des HSO_3^--Anions oder des SO_2-Moleküls. In den beiden letztgenannten Fällen muß auch der Einfluß des Sulfits aufgrund seiner zelltoxischen Eigenschaften berücksichtigt werden.

Es erfolgte die Messung der Sulfat-Aufnahme bei gleichzeitiger Zugabe von Sulfit. In dieser Versuchsanordnung wurde durch Variation des pH-Wertes und der eingewogenen Menge Sulfit nach dem in Tab. 4 angegebenen Schema jeweils eine molekulare Form konstant gehalten und unter diesen Bedingungen die Hemmung der Sulfataufnahme durch die verschiedenen Sulfit-Species ermittelt.

Tab. 4: Beziehung zwischen pH-Wert, Gesamtsulfit und dem Verhältnis SO_2 : HSO_3^- : $SO_3^{=}$ (nach SCHIMZ, 1980)

pH	Sulfitkonzentration (mM)				konstante molekulare Form des Sulfits
	SO_2	HSO_3^-	$SO_3^{=}$	Na_2SO_3*	
4.0	0.025	3.91	0.004	3.95	HSO_3^- (A)
4.6	0.006	3.91	0.019	3.94	
5.8	0	3.92	0.48	4.4	
4.0	0.102	15.752	0.018	15.873	$SO_3^{=}$ (B)
4.4	0.015	5.786	0.018	5.819	
5.0	0.00087	1.426	0.018	1.444	
5.6	0	0.358	0.018	0.375	
4.0	0.0102	1.575	0.00175	1.587	SO_2 (C)
4.4	0.0102	4.041	0.0122	4.064	
5.0	0.0102	16.713	0.205	16.93	

* Gesamtsulfit, eingewogen als Na_2SO_3-Salz in fester Form

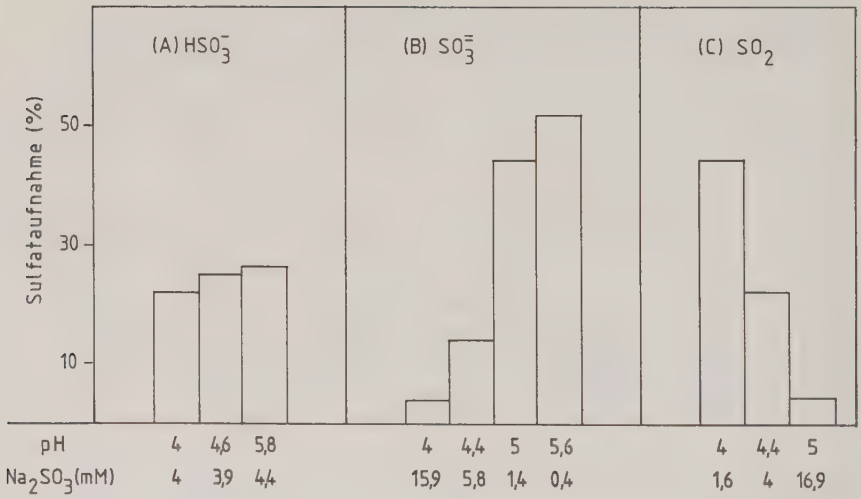

Abb. 8: Einfluß der verschiedenen molekularen Formen des Sulfits auf die Sulfataufnahme

Konstante molekulare Form des Sulfits:
(A) HSO_3^-; (B) $SO_3^=$; (C) SO_2

Die Sulfataufnahme (Stamm 36) ohne Sulfit bei dem jeweiligen pH-Wert diente als Bezugspunkt (100%). Die Sulfataufnahme nach Zugabe von Sulfit ist als prozentualer Anteil der ungehemmten Aufnahme bei dem entsprechenden pH-Wert dargestellt. Die experimentellen Bedingungen, d.h. pH-Wert, eingewogene Sulfit-Konzentration und Verteilung der molekularen Formen sind in Tab. 4 zusammengefaßt.
Die methodischen Einzelheiten des Versuchs sind unter 2.7.1 beschrieben.

Unter der Voraussetzung, daß nur eine der drei molekularen Formen des Sulfits eine Hemmwirkung zeigt, ist allein die Konzentration dieser Molekülform maßgebend; die beiden anderen spielen hierbei keine Rolle. Das heißt, daß bei konstanter Konzentration der für die Hemmung verantwortlichen Species trotz unterschiedlicher Gesamtsulfitkonzentration der gleiche Hemmeffekt zu erwarten ist. In den übrigen Fällen - bei gleicher Konzentration je einer der

beiden anderen Species - dürfte keine konstante Hemmung auftreten, sondern die Stärke der Hemmung müßte der Konzentration der den Transport beeinflussenden Molekülform entsprechen.

Die Abbildungen 8 und 9 machen deutlich, daß nur bzw. überwiegend (vgl. Diskussion 4.1) das HSO_3^--Anion die Sulfataufnahme beeinflußt.

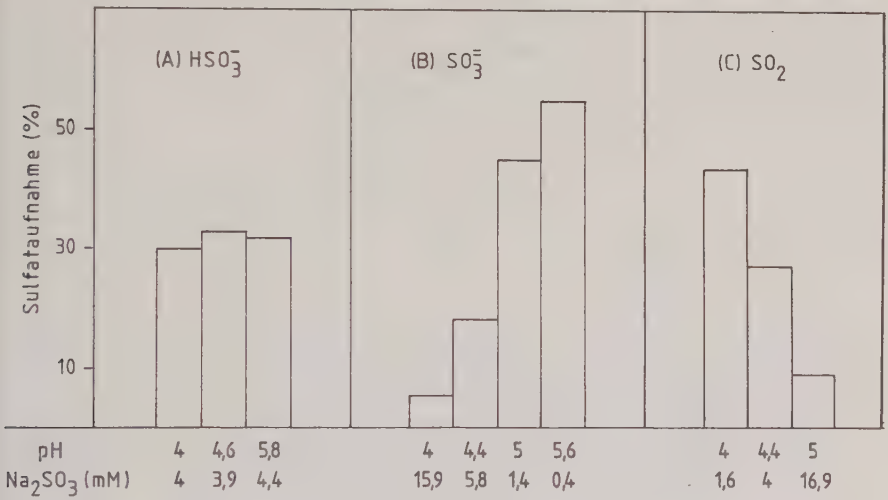

Abb. 9: Einfluß der verschiedenen molekularen Formen des Sulfits auf die Sulfataufnahme.
Die experimentellen Einzelheiten zu diesem Versuch (Stamm 27) sind in der Legende zu Abb. 8 beschrieben.

Es zeigte sich, daß nur im Falle einer konstanten HSO_3^--Konzentration eine konstante Hemmung zu verzeichnen war (Abb. 8 A und 9 A). Unter diesen Bedingungen schwankten die SO_2- bzw. $SO_3^=$-Konzentrationen um den Faktor 100 (vgl. Tab. 4, Spalte A). Bei den anderen Versuchsanordnungen (Abb. 8 B und C; Abb. 9 B und C) war der Hemmeffekt nicht konstant, sondern entsprach der vorhandenen Menge an HSO_3^- (Tab. 4, Spalte B und C).

3.1.2.4 Analyse des Hemmtyps

Durch die kinetische Analyse der Sulfithemmung könnte geklärt werden, ob es einen gemeinsamen Träger für Sulfat und Sulfit gibt.
Beim Transport zweier Substrate durch den gleichen Träger ist eine kompetitive Hemmung des Transports zu erwarten.
Ergibt die Kinetik dagegen davon abweichende Hemmtypen, sind eher andere Wirkungsmechanismen in Erwägung zu ziehen, wie z.B. die Kompetition um die Energiequelle oder eine direkte Wechselwirkung mit dem Träger, jedoch nicht am katalytischen Zentrum (NEAME und RICHARDS, 1972).

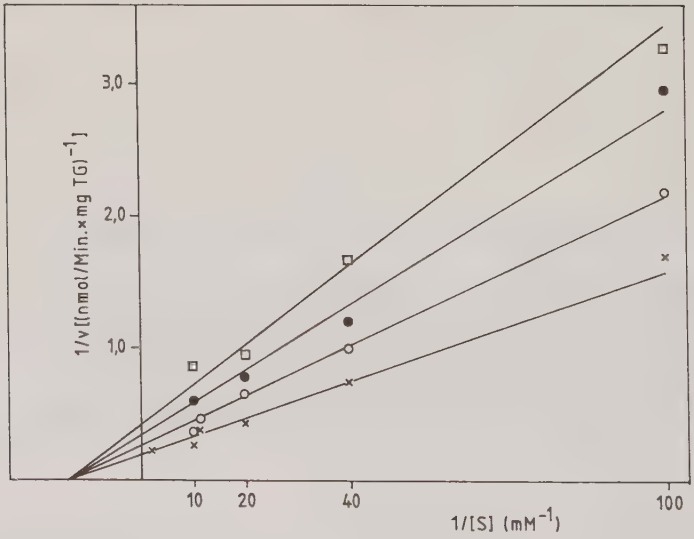

Abb. 10: Nicht kompetitive Hemmung der Sulfataufnahme durch Sulfit

x Kontrolle ohne Inhibitor; o 0.5 mM Na_2SO_3;
● 0.75 mM Na_2SO_3; □ 1.0 mM Na_2SO_3

Zur Analyse der kinetischen Daten (Stamm 36) wurde die doppelt reziproke Auftragung 1/v gegen 1/[S] nach LINEWEAVER-BURK (1934) gewählt.

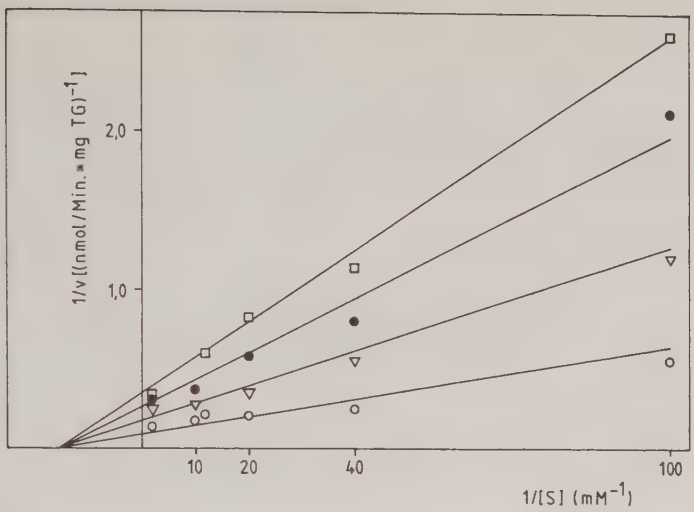

Abb. 11: Nicht-kompetitive Hemmung der Sulfataufnahme durch Sulfit

o Kontrolle ohne Inhibitor; ▽ 0.5 mM Na_2SO_3;
● 0.75 mM Na_2SO_3; □ 1.0 mM Na_2SO_3

Zur Analyse der kinetischen Daten (Stamm 27) wurde die doppelt reziproke Auftragung 1/v gegen 1/[S] nach LINEWEAVER-BURK (1934) gewählt.

Aus den Abbildungen 10 und 11 geht hervor, daß die Sulfataufnahme in dem gewählten Konzentrationsbereich einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Der K_T-Wert für Stamm 36 liegt bei 0.071 mM, für Stamm 27 bei 0.065 mM. V_T beträgt 5 nmol/Min. x mg TG (Stamm 36) bzw. 10 nmol/Min. x mg TG (Stamm 27).

Für die Sulfat-Aufnahme der beiden Sulfit-bildenden Stämme 36 und 27 konnte eine nicht-kompetitive Hemmung durch Sulfit nachgewiesen werden (Abb. 10 und 11).
Diese Ergebnisse machen deutlich, daß der meßbare (vgl. Diskussion 4.1) Effekt des Sulfits auf die Sulfataufnahme nicht durch eine Kompetition um denselben Träger bedingt sein kann.

Die meßbare Hemmung der Sulfataufnahme ist auf das HSO_3^--Molekül zurückzuführen ist (Abb. 8 und 9). Die hemmkinetischen Daten zeigen, daß Bisulfit nicht über den Sulfat-Träger transportiert wird (Abb. 10 und 11). Diese Ergebnisse machen ein gemeinsames Transportsystem von Sulfat und Sulfit unwahrscheinlich.
Ein eventueller Effekt von $SO_3^=$ oder SO_2 auf die Sulfataufnahme kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Allerdings ist er nicht meßbar. Auf die letztgenannte Überlegung wird in der Diskussion (vgl. 4.1) näher eingegangen.

3.2 Sulfit-Efflux

Es galt als nächstes, den Sulfit-Efflux experimentell zu charakterisieren und auf diese Weise zu klären, ob der Efflux über ein Sulfit-spezifisches oder ein anderes Transportsystem erfolgt.

3.2.1 Orientierende Vorversuche und Optimierung der Versuchsdurchführung

3.2.1.1 Wachstum der Hefen mit Sulfit als einziger Schwefelquelle

Die Interpretation der Untersuchungen zum Efflux von Sulfit ist erschwert, wenn die Zellen mit Sulfat als Schwefelquelle angezogen werden. Unter diesen Bedingungen ist immer zu berücksichtigen, daß das zu transportierende Substrat ein Stoffwechselprodukt ist. Dies könnte dazu führen, daß Ergebnisse nicht eindeutig zu beurteilen sind, da sich nicht entscheiden läßt, ob der gemessene Effekt auf den Stoffwechsel oder auf den Transport zurückzuführen ist.
Auf diesem Grunde wurde versucht, die Zellen mit Sulfit als einziger Schwefelquelle zu kultivieren, d.h. also, sie mit Sulfit zu beladen. Damit wäre die Sulfatreduktion zu Sulfit unnötig und mögliche Stoffwechseleinflüsse bräuchten nicht berücksichtigt zu werden.
Die Wachstumsversuche erfolgten unter Standardbedingungen mit ständiger Stickstoffbegasung und 3 mM Na_2SO_3 als Schwefelquelle.

Abb. 12 macht deutlich, daß die Hefen auf diese Weise nicht mit Sulfit beladen werden können. Ein Teil des eingewogenen Sulfits wird sofort zu Sulfat oxidiert, anschließend aufgenommen und teilweise als Sulfit wieder ausgeschieden. Die Sulfitoxidation im Medium ist vermutlich ein rein chemischer Vorgang, der durch Metallionen katalysiert wird (POSTGATE, 1963; ROY und TRUDINGER, 1970; BRIMBLECOMBE und SPEDDING, 1974; EL-WAKIL et al., 1983).

Zusätzlich vermittelt die Abbildung den Eindruck, daß die Zellen nur Sulfat und nicht Sulfit aufnehmen können. Ausschließlich Sulfat wird dem Medium entzogen. Dieser Schluß kann jedoch nicht ohne weiteres gezogen werden, da das nicht oxidierte Sulfit in gebundener Form vorliegt und möglicherweise aus diesem Grund nicht transportiert werden kann.

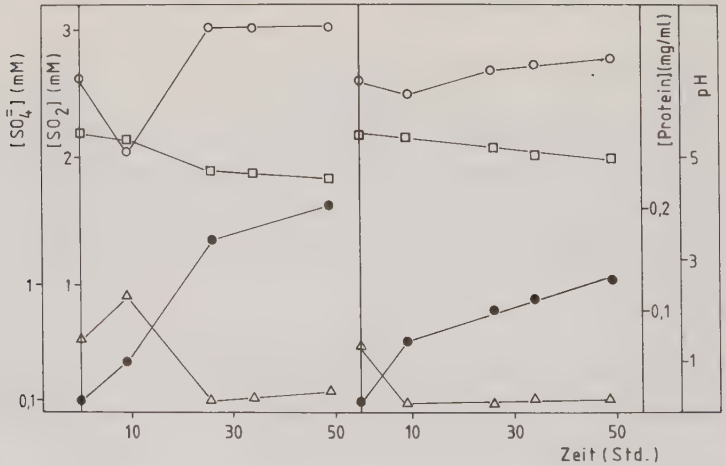

Abb. 12: Wachstum der Hefen mit Sulfit als einziger Schwefelquelle

△ Sulfat; o Sulfit; ● Protein; □ pH;
links: Stamm 27; rechts: Stamm 36

Experimentelle Einzelheiten zum Versuch siehe Text.

3.2.1.2 Sulfit-Efflux nach Wachstum der Zellen mit Sulfat

Während des Wachstums mit Sulfat nehmen die sulfitbildenden Hefen Sulfat aus dem Medium auf und scheiden gleichzeitig Sulfit aus (DOTT, 1977; HEINZEL, 1978).
Unter diesen Bedingungen ist eine Charakterisierung des Efflux nicht möglich, da das im Medium vorhandene Sulfat die Interpretation der Ergebnisse stören könnte. Daher mußte zunächst eine Möglichkeit gefunden werden, den Efflux von Sulfit ohne Sulfat im Medium zu messen. Es stellte sich also die Frage, ob die Zellen mit Sulfat vorbeladen werden können.
Um dies festzustellen, wurden die Hefen mit Sulfat als Schwefelquelle kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, gewaschen und in Medium ohne Schwefelquelle suspendiert.

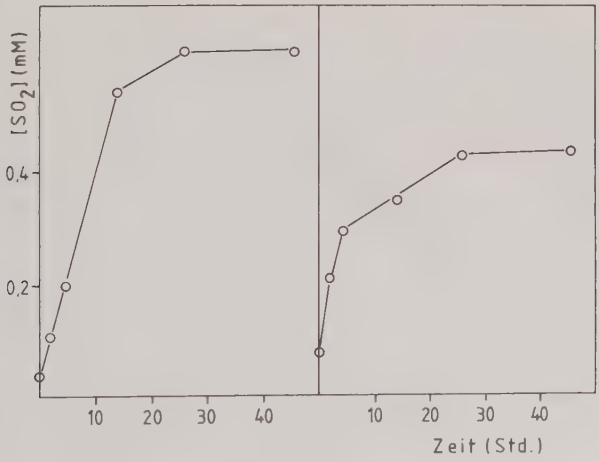

Abb. 13: Sulfitproduktion nach Anzucht auf Sulfat und anschließender Inkubation ohne externe Schwefelquelle

Links: Stamm 27; rechts: Stamm 36
Versuchsdurchführung siehe Text. Die Zellsuspensionen enthielten 3.6 (Stamm 27) bzw. 3.8 (Stamm 36) mg TG/ml

Es zeigte sich (Abb. 13), daß die Zellen in der Lage sind, auch ohne externes Sulfat bis zu 24 Stunden lang Sulfit auszuscheiden. Der für das Wachstum nicht benötigte Schwefel wird also teilweise zunächst in der Zelle gespeichert. Während des Versuchs nahm das Trockengewicht um die Hälfte (Stamm 27) bzw. um das Doppelte (Stamm 36) zu. Bei dem im Überstand nachgewiesenen Sulfit handelt es sich ausschließlich um gebundenes Sulfit (vgl. 3.2.1.4).

3.2.1.3 Sulfit-Efflux in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Um die Messung des Efflux zu optimieren, wurde in einem Wachstumsversuch festgestellt, welche Wachstumsphase für die Messung am geeignetsten ist, d.h. wann die Zellen bei anschließender Inkubation ohne Schwefelquelle pro mg Trockengewicht die größte Menge Sulfit ausscheiden.

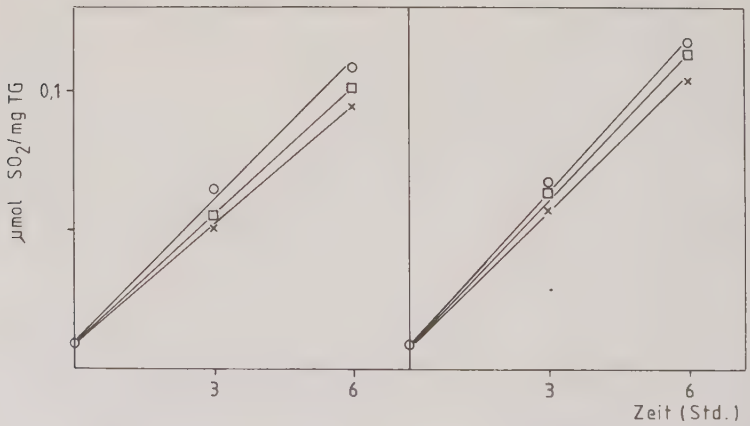

Abb. 14: Sulfit-Efflux in Abhängigkeit von der Wachstumsphase
Links: Stamm 27; rechts: Stamm 36.
Die experimentellen Einzelheiten zu diesem Versuch sind unter 2.7.2.1 beschrieben; nach 24 Stunden (x), 48 Stunden (o) und 72 Stunden (□) wurden die Zellen geerntet und der Efflux verfolgt.

Zu diesem Zweck wurden die Hefen in verschiedenen Wachstumsphasen geerntet (frühe und späte exponentielle sowie frühe stationäre Phase) und der Efflux verfolgt.
Es zeigte sich, daß, bezogen auf das Trockengewicht, in allen Wachstumsphasen die gleiche Menge Sulfit ausgeschieden wurde (Abb. 14). Daher fanden bei den folgenden Experimenten zum Sulfit-Efflux 72 Stunden alte Kulturen Verwendung.

3.2.1.4 Ermittlung geeigneter Bestimmungsmethoden für die Messung des Sulfit-Efflux

Auf einige Aspekte des experimentellen Arbeitens mit Sulfit wurde bereits eingegangen. Dazu gehören die Reaktivität des Bisulfit-Moleküls sowie das Auftreten verschiedener molekularer Formen in wässriger Lösung, die leichte Oxidierbarkeit und die Toxizität.
Im Hinblick auf Untersuchungen an Hefen und das Durchführen von Transportuntersuchungen waren noch andere Gesichtspunkte zu berücksichtigen, und zwar eine ausreichende Empfindlichkeit der Bestimmungsmethode, die Möglichkeit der Probennahme in kurzen Abständen und das Auftreten von "gebundenem" Sulfit. Dies ist auf die Fähigkeit des Bisulfit-Moleküls zurückzuführen, sich an Carbonylverbindungen anzulagern und Sulfonate zu bilden (REHM et al., 1964; SCHROETER, 1966). Sowohl im Wein als auch in synthetischem Medium liegt das ausgeschiedene Sulfit in gebundener Form, und zwar an Stoffwechselprodukten der Hefen, vor (REHM et al., 1965; DITTRICH, 1977). Bei der Beurteilung des Transportvorgangs muß zwischen freiem, gebundenem und Gesamtsulfit (KIELHÖFER und AUMANN, 1957; RHEM und WITTMANN, 1963a; BURROUGHS und SPARKS, 1964) unterschieden werden.
Daher war es erforderlich, geeignete Bestimmungsmethoden für die geforderte Aufgabenstellung zu ermitteln. Sie mußten folgende Bedingungen erfüllen:
(1) bei der Sulfitbestimmung muß zwischen freiem und gebundenem Sulfit differenziert werden können;

(2) die Nachweismethoden müssen schnell durchführbar sein, um eine Probenahme in kurzen Zeitabständen zu gewährleisten;
(3) Die Bestimmung darf durch andere Komponenten des Inkubationsmediums, wie z.B. Sulfat oder Glucose, nicht gestört werden.

Die colorimetrischen Methoden zur Sulfitbestimmung nach GRANT (1947) und nach WEST und GAEKE (1957) werden durch andere Schwefelverbindungen gestört (DOTT, 1977; BAUMGARTEN, 1981). Eigene Untersuchungen haben gezeigt, daß sich bis zu 4 mM Na_2SO_4 im Ansatz nicht auswirken. Hingegen ist eine deutliche Abhängigkeit des Sulfitnachweises vom Glucosegehalt des Mediums festzustellen. Bei 5 ml anaeroben Mediums pro Ansatz wird nur 59% des eingesetzten Sulfits wiedergefunden.
Mit den colorimetrischen Methoden ist es also nicht möglich, zwischen freiem und gebundenem Sulfit zu unterscheiden, bzw. das Gesamtsulfit zu bestimmen. Sie konnten aus diesem Grunde nicht eingesetzt werden.

Die präparative Trennung von Sulfit auf Dowex-Ionenaustauscher nach TRUDINGER (1964) und IGUCHI (1958a,b) ermöglicht zwar die Trennung von Sulfit und anderen Schwefelanionen, ist jedoch für die folgenden Untersuchungen nicht geeignet, da zum einen die Dauer der Durchführung für Transportuntersuchungen zu lang ist und zum anderen der Nachweis des gebundenen Sulfits auch mit dieser Methode nicht möglich ist.

Mit der Sulfitbestimmung durch Destillation (PAUL, 1958) läßt sich das Gesamtsulfit nachweisen. Außerdem ist es möglich, zwischen freiem und gebundenem Sulfit zu unterscheiden. Allerdings ist die Destillation hinsichtlich der Genauigkeit nicht mit einer colorimetrischen Bestimmung zu vergleichen. Daher ist sie für Transportuntersuchungen nur bedingt anwendbar. Auch eine Probenahme in kurzen Abständen ist nicht möglich (vgl. 2.6.4).
Es wurde versucht, durch Modifikation der Versuchsanordnung die Empfindlichkeit der Methode zu erhöhen (vgl. 2.6.4.3). Allerdings war der zusätzliche Zeitaufwand (weitere 45 Minuten) nicht

gerechtfertigt, da sich die Genauigkeit nur unwesentlich erhöhte. Aus diesem Grund wurde die Methode von PAUL (1958) unverändert übernommen, wenn auf eine chemische Sulfitbestimmung nicht verzichtet werden konnte (s.u.).

In den meisten der hier durchgeführten Versuche wurde radioaktiv markiertes Sulfat eingesetzt (vgl. 2.7.2.2). Diese Methode ist wesentlich genauer als die Destillation und ermöglicht eine Probenahme auch in kurzen Abständen (1 - 2 Minuten). Der Einsatz dieser Methode war jedoch weder in allen Fällen möglich noch ausreichend. In diesen Fällen fand die Destillationsmethode nach PAUL (1958) Anwendung (vgl. 2.6.4).

Die von der Fa. Boehringer entwickelte Methode (vgl. 2.6.6) zur enzymatischen Sulfitbestimmung wurde erst nach Abschluß der experimentellen Arbeit veröffentlicht. Sie ist um den Faktor 10^2 empfindlicher und wesentlich genauer als die Destillation. Auch können beliebig viele Proben gleichzeitig genommen werden. Allerdings erfaßt die enzymatische Bestimmung nur das Gesamtsulfit, eine Unterscheidung zwischen gebundenem und freiem Sulfit ist nicht möglich.

3.2.2 Einfluß von Substratanaloga und anderen Anionen

Beim Transport zweier Substrate durch das gleiche Transportprotein läßt sich unter bestimmten Bedingungen eine "beschleunigte Austauschdiffusion", auch Transmembraneffekt genannt, nachweisen (MALONEY et al., 1975; HÖFER, 1977). Dies Phänomen führt, aufgrund des Austauschs zwischen beiden Molekülen, zu einem beschleunigten Flux des einen Substrats durch die Membran bei Anwesenheit des anderen auf der Transmembranseite. Es ist dadurch bedingt, daß der Träger-Substrat-Komplex die Membran schneller durchquert als das unbesetzte Träger-Molekül. Der Transmembraneffekt wurde sowohl bei der Aufnahme von Substraten als auch beim Transport aus der Zelle beobachtet.

Experimentell läßt er sich durch eine Beschleunigung des Efflux in substrathaltigem gegenüber substratfreiem Medium nachweisen.

Tab. 5: Einfluß von Sulfat und anderen Anionen auf den Sulfit-Efflux

Substrat	(mM)	Sulfit-Efflux (%) (nach 30 Minuten)
Na_2SO_4	1.0	100
	5.0	100
	10.0	100
KH_2PO_4	7.5	100
	10.0	100
K_2HPO_4	7.5	100
	10.0	100
Na_2MoO_4	7.5	100
	10.0	100
Na_2CrO_4	7.5	85.9
Na_2SeO_3	1.0	95.9
	10.0	85,9
Na_2SeO_4	1.0	94.7
	10.0	68.4
$Na_2S_2O_3$	10.0	100
NaCl	10.0	100

Durchführung des Versuchs wie unter 2.7.2.2 beschrieben. Die gewaschenen Zellen (Stamm 36) wurden in Puffer suspendiert, der das zu testende Anion enthielt. Als Kontrolle (100%) diente der Efflux in Puffer ohne Zusatz.

Im vorliegenden Fall sollte überprüft werden, ob ein Austausch zwischen Sulfit und einem anderen Anion nachgewiesen werden könnte. Daher wurde der Sulfit-Efflux in Gegenwart verschiedener Anionen verfolgt (Tab. 5).
Die in Tab. 5 aufgeführten Anionen wurden aus folgenden Gründen ausgewählt: Wie schon erläutert, ist ein gemeinsamer Träger für Sulfat und Sulfit nicht auszuschließen. Daher kamen Sulfat und seine Analoga Molybdat, Selenat, Selenit, Chromat und Thiosulfat in Betracht.

Ein anderes mögliches Anion ist das Phosphat-Anion. Bei Mitochondrien und Chloroplasten wurde beobachtet, daß derselbe Träger den Transport von Phospat und Sulfat vermittelt (CROMPTON et al., 1974; HAMPP und ZIEGLER, 1977; MOURIOUX und DOUCE, 1979; SPEDDING et al., 1980a; HAMPP et al., 1980; SARIS, 1980). Bei Erythrozyten und anderen tierischen Zellen durchquert Sulfat die Membran über das Anionentransportsystem, beispielsweise im Austausch gegen Chlorid-Ionen (WOLOSIN, 1980; BRAZY und DENNIS, 1981; LOWE und LAMBERT, 1983; LANGRIDGE-SMITH, 1983). Daher wurde auch der Einfluß dieses Ions auf den Sulfit-Efflux getestet.

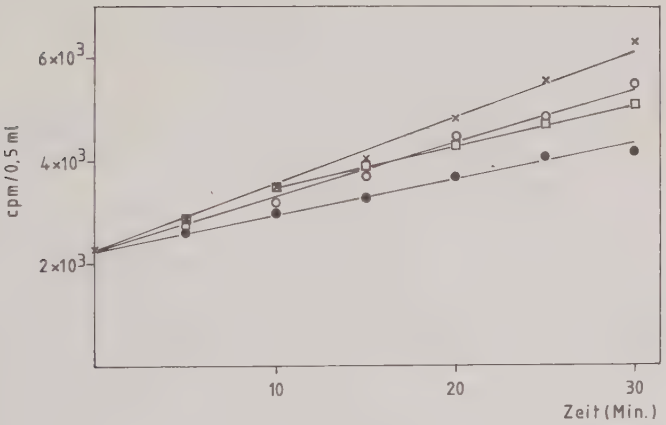

Abb. 15: Einfluß von Selenit und Selenat auf den Sulfit-Efflux
x Kontrolle; · □ 10 mM Selenit; o 1 mM Selenat; ● 10 mM Selenat
Durchführung siehe Legende zu Tab. 5.

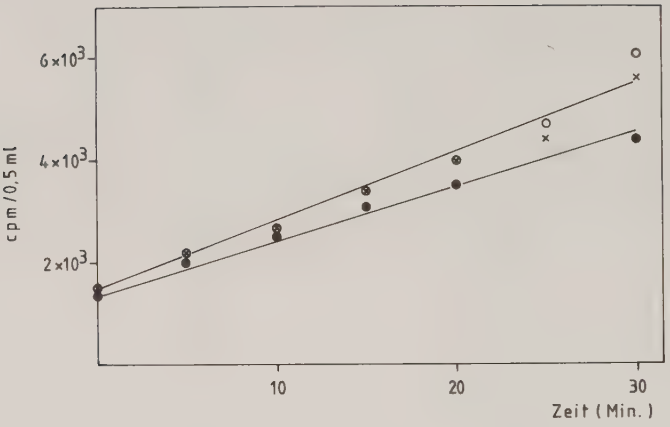

Abb. 16: Einfluß von Molybdat und Chromat auf den Sulfit-Efflux
x Kontrolle; • 7.5 mM Chromat; o 10 mM Molybdat
Durchführung siehe Legende zu Tab. 5.

Ein Transmembraneffekt konnte bei keinem der untersuchten Anionen festgestellt werden. Bei den Anionen $CrO_4^{=}$, $SeO_3^{=}$ und $SeO_4^{=}$ allerdings zeigte sich eine Hemmung des Efflux (Tab. 5, Abb. 15 und 16.).

Die Tatsache, daß kein Membraneffekt nachweisbar ist, läßt jedoch nicht den Schluß zu, daß tatsächlich keine Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Anionen stattfindet.
Ein Transmembraneffekt läßt sich nur dann experimentell aufzeigen, wenn die intrazelluläre Konzentration des zu untersuchenden Substrats ausreichend hoch ist. Bei sehr geringer intrazellulärer Konzentration kann eine theoretisch mögliche Beschleunigung des Efflux in der Praxis nicht nachgewiesen werden.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob und in welchen Konzentrationen freies Sulfit in den Zellen vorhanden ist. Wie die Versuche zeigen, sind die Zellen in der Lage, über 24 Stunden lang Sulfit auszuscheiden, ohne daß eine externe Schwefelquelle vorhanden ist (Abb. 13). Das bedeutet, daß die Hefen ein intrazelluläres Schwefelreservoir besitzen müssen. Betrachtet man die Menge des ausgeschiedenen Sulfits (0.4 bzw. 0.7 mM), läßt sich die intrazelluläre Schwefelkonzentration abschätzen, die nötig ist, um den 24-stündigen Efflux zu ermöglichen. Legt man beispielsweise ein Verhältnis von intrazellulärem zu extrazellulärem Volumen von etwa 1 : 100 zugrunde (vgl. Versuchsdurchführung zum Efflux, 2.7.2.2), ist eine intrazelluläre Konzentration von 40 - 70 mM erforderlich, um den Efflux von 0.4 bis 0.7 mM zu ermöglichen. Diese Sulfitkonzentration wäre absolut toxisch für die Zelle (SCHIMZ und HOLZER, 1979; SCHIMZ, 1980; BAUMGARTEN, 1981). Aufgrund dieser Vorüberlegungen kann man freies Sulfit als einzige intrazelluläre Substanz ausschließen.

3.2.3 Einfluß von Methionin und Cystein

Der Sulfat-Träger unterliegt einer Repression durch die Schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein, den Endprodukten der Sulfat-Assimilation.
Um eine mögliche Abhängigkeit des Sulfit-Efflux vom Sulfat-Transportsystem nachzuweisen, wurde der Einfluß von Methionin und Cystein auf den Sulfit-Efflux untersucht. Falls das Sulfat-Transportsystem tatsächlich für den Sulfit-Efflux verantwortlich ist, ist eine Hemmung zu erwarten.

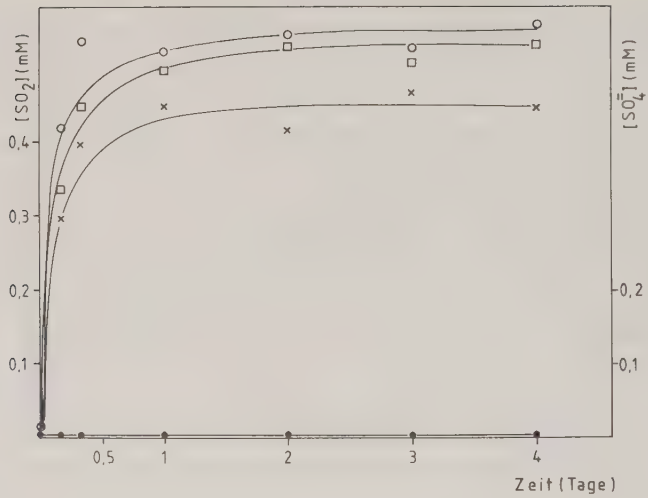

Abb. 17: Einfluß von Cystein und Methionin auf den Sulfit-Efflux

X Sulfitproduktion der Kontrolle (Medium ohne Zusatz); □ Sulfitproduktion nach Zugabe von 1.5 mM Cystein; o Sulfitproduktion nach Zugabe von 1.5 mM Methionin; ● extrazelluläres Sulfat in der Kontrolle, der Cystein- und der Methionin-Kultur.

Die experimentellen Einzelheiten zu diesem Versuch (Stamm 36) sind unter 2.7.2.1 beschrieben; die Zellsuspension enthielt zu Beginn des Versuchs 3.9 mg TG/ml

Bei dem hier untersuchten Sulfit bildenden Stamm kann ein Einfluß von Methionin und Cystein auf den Sulfat-Stoffwechsel und eine dadurch bedingte Reduktion der Sulfitbildung aufgrund der Untersuchungen von DOTT (1977), HEINZEL (1978) und BAUMGARTEN (1981) ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu dem entsprechenden Normalstamm werden die der Sulfitbildung vorausgehenden Enzyme (vgl. Abb. 2), ATP-Sulfurylase und PAPS-Sulfotransferase durch Methionin und Cystein nicht reprimiert (Ausnahme: PAPS-Sulfotransferase bei Zugabe von Cystein), das folgende Enzym

Sulfitreduktase dagegen unterliegt einer Repression. Eine Verringerung des Efflux wäre daher ausschließlich auf ein Transport bedingtes Phänomen zurückzuführen und ein deutlicher Hinweis auf einen Sulfit-Transport aus der Zelle unter Beteiligung des Sulfat-Transportsystems.

Die Zugabe der beiden Aminosäuren bewirkt keine Hemmung des Sulfit-Efflux (Abb. 17). Statt dessen tritt eine Steigerung um 22 bzw. 27% ein. Der gleiche Versuch wurde zur Kontrolle mit einer radioaktiv markierten Kultur durchgeführt. Auch in diesem Fall führte die Zugabe von Methionin und Cystein zu einem erhöhten Ausfluß von Radioaktivität (Ergebnisse nicht dargestellt).
Er ist jedoch nicht auf einen Efflux von nicht mehr benötigtem Sulfat zurückzuführen (Abb. 17).
Im Verlauf der Experimente war ein Wachstum der Zellen (2 - 3 Verdoppelungen) zu verzeichnen. Der Ertrag lag in Gegenwart der Aminosäuren um 20 - 30% höher als bei der Kontrolle.

Auf das Ergebnis dieses Versuchs wird in der Diskussion näher eingegangen.

3.2.4 Energieabhängigkeit des Transports

Im Hinblick auf die Energieabhängigkeit unterscheidet man zwei Arten von Transportvorgängen.
Es gibt sowohl passive, d.h. spontan ablaufende und von der Stoffwechselenergie unabhängige, als auch aktive, d.h. an Stoffwechselenergie gekoppelte Reaktionen, die gegen einen Konzentrationsgradienten verlaufen.

Zur Charakterisierung des Sulfit-Efflux wurde daher als nächstes das Kriterium der Energieabhängigkeit untersucht. Durch die Wahl der Hemmstoffe sollte festgestellt werden, ob es sich um einen passiven oder primär bzw. sekundär aktiven Prozeß (BOWMAN et al.,

1978; KOTYK, 1980; KOTYK und SIGLER, 1981) handelt. Dazu wurden die Entkoppler CCCP, DNP und TSA und die Hemmstoffe der Plasmamembran-ATPase DCCD und DES (GOFFEAU und SLAYMAN, 1981) eingesetzt.
Auch das Antibioticum Nystatin wurde verwandt, das aufgrund seiner Struktur mit den Sterolen der Membran reagiert (KOBAYASHI und MEDOFF, 1977). Die Folge ist ein Verlust der Membranintegrität, der zu einem relativ unspezifischen Ausfluß von Ionen führt. Auch die Permeabilität für Protonen wird erhöht (PALACIOS und SERRANO, 1978). Daher beeinflußt Nystatin auch das Membranpotential und den pH-Gradienten und somit sekundär aktive Prozesse.
Der Glykolyse-Hemmstoff IAA fand Verwendung, da er Hinweise auf eine direkte Beteiligung von ATP am Transportvorgang geben könnte.

In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß es wichtig war, die Hefen unter anaeroben Bedingungen zu kultivieren. Es mußte berücksichtigt werden, daß Entkoppler sowohl auf die Cytoplasmamembran, als auch auf die mitochondrielle Membran wirken. Daher mußte ausgeschlossen werden, daß Hemmeffekte auftreten, die indirekt durch die Beeinflussung des Stoffwechsels verursacht sind. Zu denken ist beispielsweise an eine Hemmung des assimilatorischen Schwefelstoffwechsels durch mangelnde Energieversorgung. Dies würde zu einer geringeren Sulfitproduktion führen, die jedoch nichts mit dem Transportvorgang selbst zu tun hat.

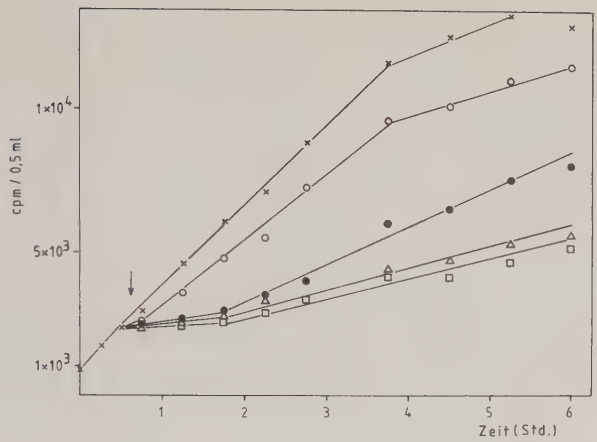

Abb. 18: Einfluß von DNP auf den Sulfit-Efflux bei pH 5.0 (Stamm 36)

↓ Zugabe des Entkopplers; x Kontrolle; Inhibitorkonzentration: o 0.5 mM, ● 1.0 mM; △ 2.5 mM; □ 5.0mM.

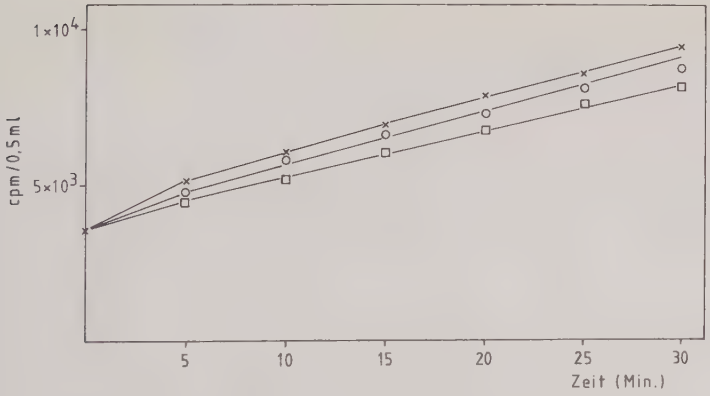

Abb. 19: Einfluß von Nystatin auf den Sulfit-Efflux bei pH 5.0 (Stamm 36)

x Kontrolle; o 10 µM Nystatin; □ 100 µM Nystatin

Bei einem extrazellulären pH-Wert von 5.0 bewirken DNP und Nystatin eine deutliche Hemmung des Sulfit-Efflux (Abb. 18 und 19). Diese Ergebnisse könnten auf einen aktiven Transport von Sulfit aus der Zelle hindeuten. Eine andere Interpretationsmöglichkeit ist jedoch ebenfalls denkbar.
Entkoppler wirken als Protonophore, d.h. sie erhöhen die Permeabilität der Membran für Protonen. Das gleiche gilt unter anderem für Nystatin. In beiden Fällen kann daher eine hohe extrazelluläre Wasserstoffionenkonzentration zu einer Senkung des intrazellulären pH-Wertes führen. Aus diesem Grund ist es möglich, daß der Einfluß von DNP und Nystatin (Abb. 18 und 19) nicht auf die Hemmung des Transportvorgangs selbst zurückzuführen ist, sondern indirekt durch eine Hemmung des Stoffwechsels bedingt ist.
Daher wurden die folgenden Experimente bei pH 6.5 durchgeführt, um den extrazellulären an den intrazellulären pH-Wert anzugleichen. Vorversuche zeigten, daß der Sulfit-Efflux durch den höheren pH-Wert des Inkubationsmediums nicht beeinflußt wird.

Tab. 6: Einfluß von Entkopplern auf den Sulfit-Efflux (Stamm 27)

Entkoppler	Konzentration (mM)	Efflux + (%)
CCCP	0.025	149.0
	0.06	145.0
	0.1	105.9
	0.25	96.1
	0.5	26.0
DNP	1.0	98.6
	2.0	96.3

Kontrolle ohne Entkoppler = 100%;
+ Sulfit-Efflux nach 6 Stunden Inkubationsdauer

Bei pH 6.5 wird der Efflux von Sulfit weder durch Entkoppler noch durch Inhibitoren der protonentranslozierenden ATPase gehemmt (Tab. 6, Abb. 20, 21 und 22). Von den fünf untersuchten Substanzen zeigte nur TSA einen hemmenden Einfluß (30%) auf den Efflux (Abb. 22). Statt dessen ist in den meisten Fällen (mit Ausnahme des DNP) eine Steigerung des Sulfit-Efflux zu verzeichnen. Bei Stamm 36 wird die extrazelluläre Radioaktivität nach 6 Stunden um 5% (DES), 10% (CCCP) bzw. 50% (DCCD) erhöht. Auch bei Stamm 27 konnte nach Zugabe von CCCP mehr Sulfit (analytische Bestimmung nach PAUL (1958)) im Überstand gemessen werden, als bei der Kontrolle ohne Entkoppler (Tab. 6). Erst bei extrem hohen Konzentrationen an CCCP (das 50-fache der Konzentration, die in der Regel aktive Transportsysteme bei Hefen hemmt) wird die Sulfitproduktion deutlich verringert.

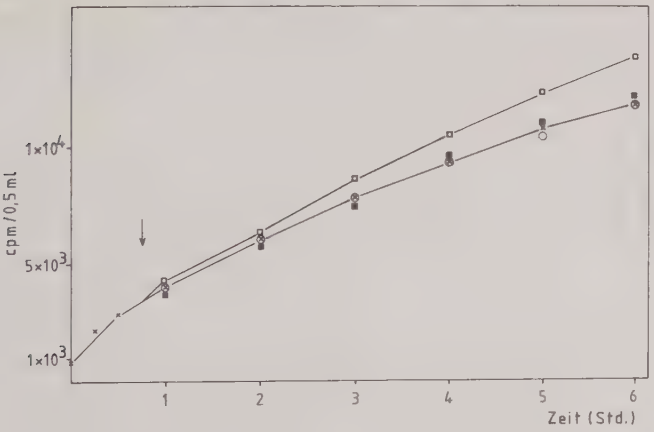

Abb. 20: Einfluß von CCCP auf den Sulfit-Efflux (Stamm 36)
x Kontrolle ohne Inhibitor; CCCP-Konzentration:
o 0.33 mM; ■ 0.66 mM; □ 0.17 mM;
↓ Zugabe des Inhibitors.

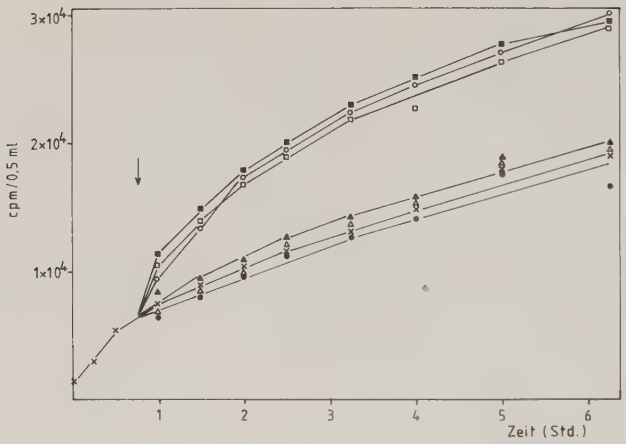

Abb. 21: Einfluß von DNP und DCCD auf den Sulfit-Efflux (Stamm 36)

x Kontrolle ohne Inhibitor; DCCD-Konzentrationen: o 1.0 mM; □ 2.5 mM; ■ 5.0 mM; DNP-Konzentrationen: ● 1.0 mM; ▲ 2.5 mM; △ 5.0 mM; ↓ Zugabe der Inhibitoren

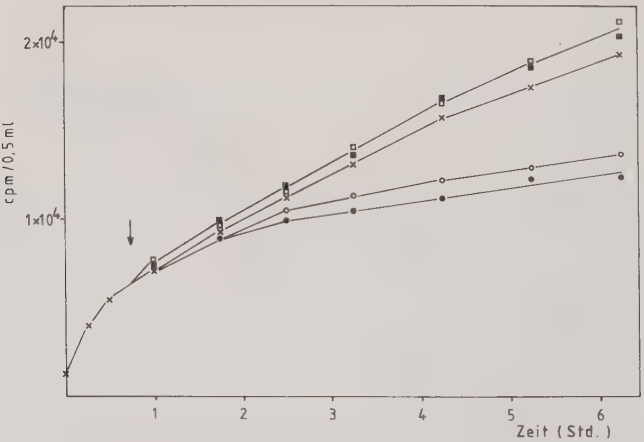

Abb. 22: Einfluß von DES und TSA auf den Sulfit-Efflux (Stamm 36)

x Kontrolle ohne Inhibitor; TSA-Konzentrationen: o 1.0 mM; ● 5.0 mM; DES-Konzentrationen: □ 1.0 mM; ■ 5.0 mM; ↓ Zugabe der Inhibitoren

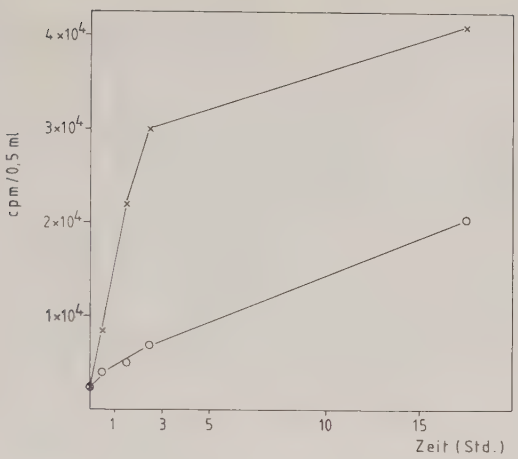

Abb. 23: Einfluß von IAA auf den Sulfit-Efflux (Stamm 36)
x Kontrolle ohne Inhibitor; o 1.0 mM IAA.

Anders als die zuvor untersuchten Substanzen wirkt sich IAA, ein Inhibitor der Glycolyse, auf den Sulfit-Efflux aus. In diesem Fall ist eine eindeutige Hemmung zu verzeichnen (Abb. 23).

Die vorhergehenden Experimente zeigen, daß zwei der drei Entkoppler und die beiden ATPase-Inhibitoren nicht zu einer Hemmung des Efflux führen. Demnach handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um einen sekundär aktiven Transport. Da jedoch IAA die Sulfitausscheidung deutlich verringert, ist eine direkte Beteiligung von ATP am Transportprozeß nicht ganz auszuschließen. Allerdings ist ein entsprechender Transportvorgang - eine Anionen transportierende ATPase - bisher bei Hefen nicht bekannt (KOTYK, 1980). Viel wahrscheinlicher ist es, daß IAA - indirekt über den Stoffwechsel - auf den Efflux einwirkt, da durch die Hemmung der Glykolyse nicht genügend Energie für die dem Transportschritt vorausgehende Sulfatreduktion bereitgestellt wird.

3.2.5 Ist der Transport oder der Stoffwechsel geschwindigkeitsbestimmend?

Die hier untersuchten Hefen scheiden unter Standardbedingungen je nach Stamm bis zu 0.7 mM Sulfit aus (Abb. 13). Es stellt sich daher die Frage, ob das ausgeschiedene Sulfit - zumindest teilweise - frei in der Zelle vorliegt oder ob der Metabolismus, d.h. die Sulfatreduktion, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für den Sulfit-Efflux darstellt.
Im Falle des Transports als geschwindigkeitsbestimmende Reaktion ist zu erwarten, daß durch die ständige Erneuerung des Inkubationsmediums die Geschwindigkeit und/oder das Ausmaß des Efflux gesteigert werden kann (HORÁK und ŘÍHOVÁ, 1982).

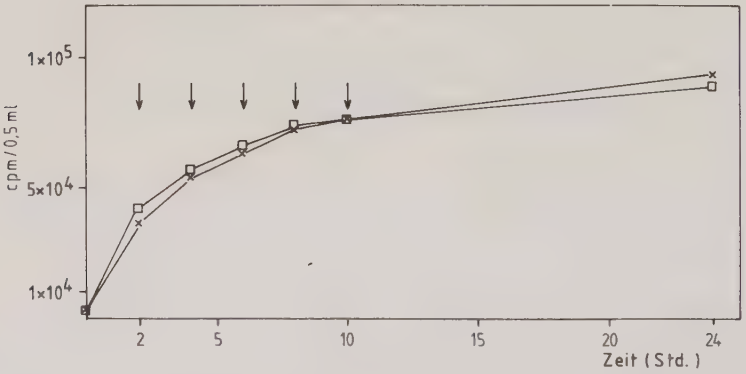

Abb. 24: Sulfit-Efflux aus vorbeladenen Zellen nach wiederholter Erneuerung des Inkubationspuffers

↓ Transfer der Zellen in frischen Puffer;
□ Efflux bei mehrfacher Erneuerung des Inkubationspuffers, aufgetragen wurde das insgesamt ausgeschiedene Sulfit; x Kontrolle, Efflux ohne Erneuerung des Inkubationspuffers.

70 ml (Stamm 36) einer radioaktiv markierten Kultur (vgl. 2.7.2.2) wurden zweimal mit Na-Citrat-Puffer, pH 5.0 gewaschen, in 40 ml des gleichen Puffers suspendiert und auf vier 50 ml Erlenmeyerkolben verteilt. Zu den angegebenen Zeitpunkten (↓) erfolgte die Bestimmung der extrazellulären Radioaktivität. Anschließend wurde der Inhalt zweier Kolben (□) zentrifugiert und im gleichen Volumen frischen Puffers aufgenommen.

Um dies zu klären, wurden mit Sulfat beladene Zellen zu den in Abb. 24 angegebenen Zeiten zentrifugiert und in frischem Puffer erneut suspendiert. Als Kontrolle diente die Messung des Efflux in Abhängigkeit von der Zeit ohne Erneuerung des Puffers. Abb. 24 zeigt, daß durch wiederholte Erneuerung des Inkubationspuffers keine Steigerung des Efflux erzielt werden kann. Dies deutet darauf hin, daß - wenn überhaupt - nur wenig freies Sulfit in den Zellen vorliegt und daher der Metabolismus geschwindigkeitsbestimmend für den Efflux ist.

3.2.6 Hemmung des Sulfit-Efflux durch extrazelluläres Sulfit

3.2.6.1 Abhängigkeit von der Sulfit-Konzentration

Es wurde der Einfluß verschiedener Sulfitkonzentrationen auf den Sulfit-Efflux untersucht.

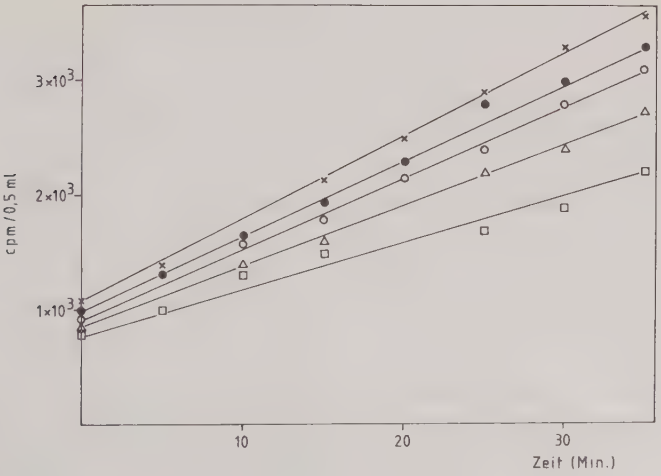

Abb. 25: Hemmung des Sulfit-Efflux durch steigende Sulfit-Konzentrationen im Inkubationsmedium (Stamm 36)
x Kontrolle ohne extrazelluläres Sulfit;
Sulfitkonzentrationen: ● 1.0 mM; o 2.5 mM;
△ 5.0 mM; □ 10.0 mM.

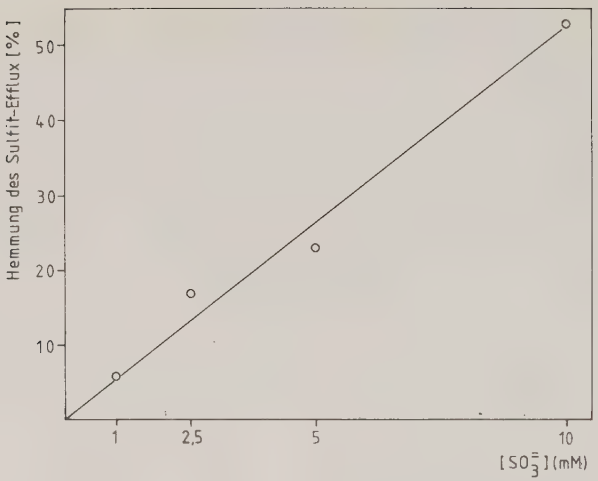

Abb. 26: Beziehung zwischen extrazellulärer Sulfitkonzentration und Hemmung des Efflux
Aufgetragen wurden die Werte aus Abb. 25 nach 30 Minuten Inkubationsdauer.

Die Abbildungen 25 und 26 machen deutlich, daß eine Hemmung des Efflux durch extrazelluläres Sulfit proportional zur eingesetzten Sulfit-Konzentration erfolgt.

3.2.6.2 Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration

Auch bei der Untersuchung des Sulfit-Transports aus der Zelle stellt sich die Frage nach der für die Hemmung verantwortlichen molekularen Form des Sulfits.

Durch Änderung des pH-Wertes des Inkubationspuffers (3.8, 4.8 und 5.8) wurde bei konstanter Sulfitaußenkonzentration (5.0 mM) das Verhältnis der drei molekularen Formen des Sulfits variiert.

Abb. 27 zeigt, daß eine deutliche Korrelation zwischen pH-Wert und Sulfithemmung besteht. Mit steigender Wasserstoffionenkonzentration vergrößert sich der Hemmeffekt. Bei einem pH-Wert von

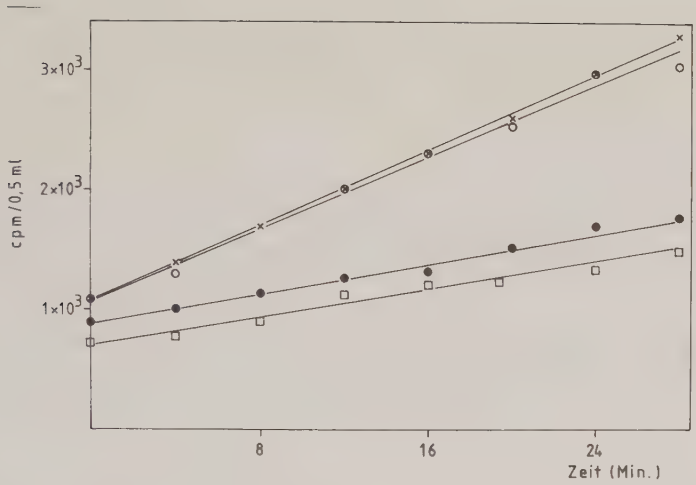

Abb.27: Einfluß des pH-Wertes auf den Sulfit-Efflux bei konstanter (5.0 mM) extrazellulärer Sulfit-Konzentration (Stamm 36)
x Kontrolle ohne Sulfit, pH 5.0; □ pH 3.8; ● pH 4.8; o pH 5.8.

5.8 erfolgt der Sulfit-Efflux fast ungehemmt. Diejenige molekulare Form des Sulfits, die bei diesem pH-Wert in analytisch nicht mehr erfaßbaren Mengen vorliegt, ist das SO_2. Die beiden Anionen HSO_3^- und $SO_3^=$ verteilen sich zu 89.04% und 10.95% (MACRIS, 1972). Die gemessene Hemmung ist offensichtlich allein von der SO_2-Konzentratiuon abhängig.

3.2.6.3 Efflux von Sulfit bei konstanter SO_2-Konzentration im Inkubationspuffer

Die Abhängigkeit der Sulfit-Hemmung von der Wasserstoffionenkonzentration (Abb. 27) legt den Schluß nahe, daß SO_2 die hemmende "Species" sein könnte. Um dies zu bestätigen, sollte der Efflux bei konstantem SO_2-Gehalt untersucht werden. Dazu wurden der pH-Wert und die eingewogene Sulfitmenge in der Form variiert, daß die SO_2-Konzentration konstant blieb (vgl. Tab. 4, Spalte C).

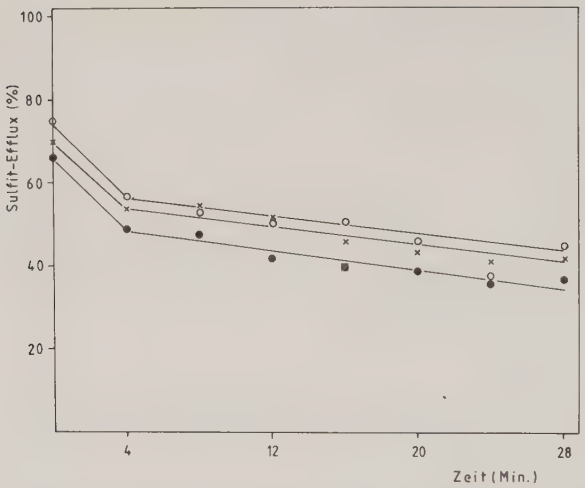

Abb. 28: Einfluß verschiedener Gesamt-Sulfitkonzentrationen auf den Sulfit-Efflux bei konstanter (0.01 mM) SO_2-Konzentration

x 1,6 mM Na_2SO_3, pH 4.0; • 4,1 mM Na_2SO_3, pH 4,4; o 16.9 mM Na_2SO_3, pH 5.0.

Die Durchführung des Versuchs (Stamm 36) erfolgte unter Standardbedingungen (vgl. 2.7.2.2). Um jedoch die gewünschte Sulfitkonzentration bei dem entsprechenden pH-Wert zu erreichen, wurden 50 ml des Puffers mit der vor dem Versuch abgewogenen Menge festen Natriumsulfits versetzt, anschließend der pH-Wert mit 1 N HCl korrigiert und die gewaschenen Zellen pro Testansatz in 7.5 ml dieses Mediums aufgenommen. Die Messung der Radioaktivität im Überstand erfolgte unter Standardbedingungen.

Abbildung 28 macht deutlich, daß trotz Variation der eingewogenen Sulfitmenge um den Faktor 10 (1.6 bis 16.9 mM, vgl. Tab. 4, Spalte C) die Hemmung des Efflux in allen Fällen gleich stark ist, und zwar 45 - 50%, je nach Inkubationsdauer. Betrachtet man die Konzentrationsänderung der verschiedenen Sulfit-Species (Tab. 4, Spalte C) erkennt man, daß die HSO_3^--Konzentration um den Faktor 10 und die des $SO_3^{=}$-Moleküls um den Faktor 100 steigt. Die konstante Hemmung stimmt daher nur mit der konstanten SO_2-Konzentration überein.

3.2.7 Ist einfache Diffusion oder ein katalysierter Transport für den Sulfit-Efflux verantwortlich?

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, daß der Sulfit-Efflux
(1) nicht an energieliefernde Prozesse gekoppelt ist und
(2) daß er schon durch geringe SO_2-Konzentrationen (0.01 mM) gehemmt wird.

Da biologische Membranen für Gase leicht durchlässig sind, ist es wahrscheinlich, daß die Hemmung des Sulfit-Efflux durch SO_2 auf die zelltoxischen Eigenschaften dieses Moleküls zurückzuführen ist.

Durch die folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob einfache Diffusion oder ein katalysierter Transport als Anion für den Sulfit-Efflux verantwortlich ist.

Auch bei der Klärung dieser Fragestellung erwies es sich als nachteilig, daß das transportierte Substrat ein Stoffwechselprodukt ist. In der Regel angewandte Methoden, wie z.B. die Erstellung eines Arrhenius-Diagramms (vgl. Diskussion 4.2), scheiden in diesem Fall von vornherein aus, da eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse nicht vorgenommen werden kann.

Das SO_2-Molekül liegt bei höheren pH-Werten (größer als 4.0) in extrem niedrigen Konzentrationen vor (Abb. 1). Oberhalb des pK_1-Wertes von 1.81 (WEAST, 1970) sinkt die SO_2-Konzentration pro pH-Einheit um den Faktor 10. Der prozentuale Anteil beträgt beispielsweise bei pH 4 0.6%, bei pH 5 0.06% und bei pH 6 0.006% (MACRIS, 1972). Das bedeutet, daß bei pH 6 eine um den Faktor 100 höhere Gesamtsulfitkonzentration vorliegen muß als bei pH 4, um die gleiche Menge an SO_2 zu erhalten.

Überträgt man diese Überlegung auf die Verhältnisse der Hefezellen, und legt man einen extrazellulären pH-Wert von 4 zugrunde, so ergibt sich eine pH-Differenz von zwei pH-Einheiten zwischen innen und außen. Unter diesen Bedingungen beträgt der intrazelluläre Wert 6 (KOTYK, 1963; RYAN und RYAN, 1972; BORST-PAUWELS, 1981; SLAVÍK, 1981; KOTYK et al., 1982b). Bei dieser Versuchsanordnung ist also eine mindestens 100-fach höhere intrazelluläre Sulfitkonzentration als außen zu fordern, damit eine einfache SO_2-Diffusion überhaupt stattfinden kann.
Daher wurde in den folgenden Versuchen die intrazelluläre Sulfitkonzentration mit der extrazellulären verglichen, um festzustellen, ob eine Gasdiffusion aufgrund der gegebenen Konzentrationsverhältnisse überhaupt möglich ist.

3.2.7.1 Orientierende Vorversuche zur Bestimmung der intrazellulären Sulfitkonzentration

Für eine mögliche SO_2-Diffusion ist nur das freie Sulfit innerhalb und außerhalb der Zelle von Bedeutung. Es stellte sich jedoch heraus, daß unter Standardbedingungen (vgl. 2.7.2) kein freies Sulfit im Inkubationsmedium nachgewiesen werden konnte. Es wurde schon darauf hingewiesen (vgl. 3.2.1.4), daß das ausgeschiedene Sulfit zum größten Teil in gebundener Form vorliegt, und zwar hauptsächlich an dem von den Hefen selbst produzierten Acetaldehyd. Da dieser ein Produkt des Gärungsstoffwechsels ist, wurde versucht, durch die Wahl aerober Bedingungen und die Verwendung anderer Kohlenstoffquellen (KOVÁČ und VAREČKA, 1981; KOVÁČ und POLIÁCHOVA, 1981; SIGLER et al., 1981; WASUNGU und SIMARD, 1982; BARNET et al., 1983) das Verhältnis von freiem zu gebundenem Sulfit zugunsten des freien Sulfits zu verschieben (Abb. 29, 30 und 31).
Außerdem mußte geprüft werden, ob die Hefen auch bei höherer Wasserstoffionenkonzentration des Mediums wachsen. Eine Kultivierung bei pH 4.0 war dem sonst verwendeten pH-Wert von 5.0 vorzuziehen, da sich im erstgenannten Fall die pH-Differenz zwischen

innen und außen vergrößert und eine 100-fach höhere intrazelluläre Sulfitkonzentration gegenüber dem Außenmedium zu fordern ist (vgl. 3.2.7).

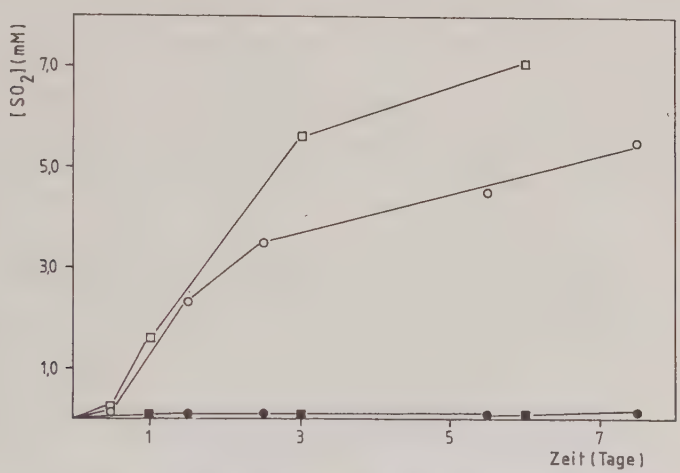

Abb. 29: Verteilung von freiem und gebundenem Sulfit bei aeroben Wachstum auf Glucose

offene Symbole: gebundenes Sulfit; geschlossene Symbole: freies Sulfit; □ pH 5.0; ○ pH 4.0.

Die Zellen (Stamm 36) wurden unter aeroben Bedingungen (vgl. 2.2.2) inkubiert. Die optische Dichte der Kultur bei 600 nm betrug zu Beginn des Versuchs 0.2.

Abb. 29 macht deutlich, daß auch unter aeroben Bedingungen bei Wachstum auf Glucose nur wenig freies Sulfit nachgewiesen werden kann. Das gleiche gilt für Äthanol als Kohlenstoffquelle (Abb. 30).

Allein der Einsatz von Glycerin als Kohlenstoffquelle führte zu einem höheren Anteil an freiem Sulfit (Abb. 30 und 31). Er schwankte je nach Wachstumsphase und pH-Wert des Wachstumsmediums zwischen 20.6 und 98.3% (Abb. 31). Dabei war der Gehalt an freiem

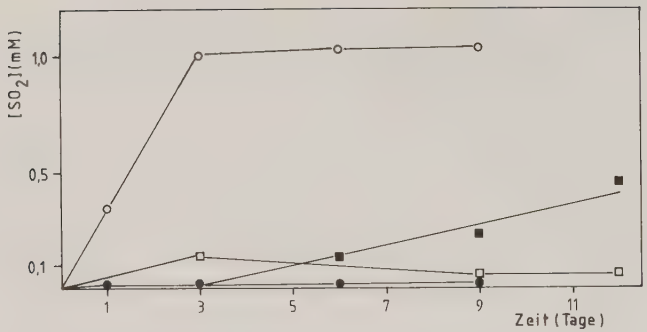

Abb. 30: Verteilung von freiem und gebundenem Sulfit bei Wachstum mit 1% Äthanol und 1% Glycerin

offene Symbole: gebundenes Sulfit; geschlossene Symbole: freies Sulfit; o Wachstum auf 1% Äthanol; □ Wachstum auf 1% Glycerin.

Verwendung fand aerobes Medium (vgl. 2.4.3), das statt Glucose 1% Äthanol bzw. 1% Glycerin enthielt. Die optische Dichte der Kultur (Stamm 36) bei 600 nm betrug zu Beginn des Versuchs 0.2.

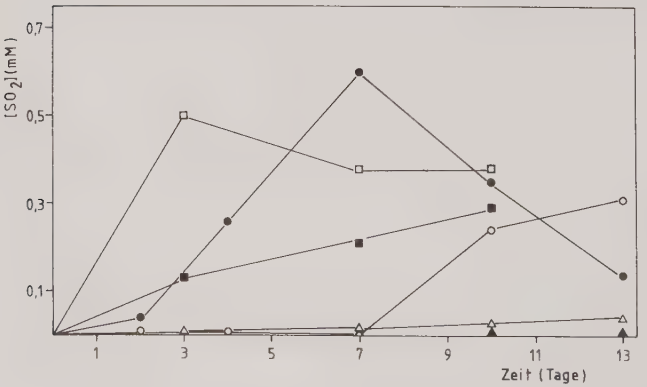

Abb. 31: Verteilung von freiem und gebundenem Sulfit bei Wachstum mit 10% Glycerin

offene Symbole: gebundenes Sulfit; geschlossene Symbole: freies Sulfit; o Stamm 36, pH 5.0; □ Stamm 36, pH 4.0; △ Stamm 27, pH 5.0.

Die Durchführung erfolgte wie in der Legende zu Abb. 30 beschrieben, jedoch enthielt das Medium 10% Glycerin.

Sulfit bei pH 4 geringer als bei pH 5. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß bei dem niedrigeren pH-Wert um eine Zehnerpotenz mehr SO_2 vorliegt, welches dann leicht aus der Lösung entweicht. Da alle Formen des Sulfits miteinander im Gleichgewicht stehen, verringert sich auf diese Weise der Sulfitgehalt des Mediums immer mehr.
Allerdings hat diese Kohlenstoffquelle langsameres Wachstum (nicht dargestellt) und eine geringere Sulfitbildung zur Folge als Glucose. Durch Wachstumsversuche mit 10%, 20% und 30% Glycerin im Medium konnte eine Steigerung des Zellertrages gegenüber 1% erzielt werden. Dabei erwies sich die Konzentration von 10% als am besten geeignet, da die Zellen bei 20% eine zu lange Anlaufphase benötigten und bei 30% nicht mehr wuchsen. Stamm 27 eignete sich für die Versuche nicht, da er unter den gewählten Bedingungen kaum Wachstum und Sulfitbildung aufwies (Abb. 31).

Abb. 31 macht deutlich, daß das Verhältnis von freiem zu gebundenem Sulfit im Verlauf des Wachstums sinkt. Ein höherer Anteil an freiem Sulfit kann offensichtlich nur um den Preis eines langsameren Wachstums, einer geringeren Sulfitbildung und eines niedrigeren Zellertrages erzielt werden. Diese Nachteile wurden durch den Einsatz größerer Kulturmengen ausgeglichen.

3.2.7.2 Aufschluß der Zellen mit Nystatin

Da Sulfit leicht oxidiert (vgl. Tab. 3), mußte zur Bestimmung der intrazellulären Sulfit-Konzentration eine geeignete Methode gesucht werden, um die Zellen schonend und unter anaeroben Bedingungen zu permeabilisieren.
Es wurden verschiedene Möglichkeiten erwogen und wieder verworfen, da sie sich als ungeeignet für das Arbeiten mit Sulfit als Substrat erwiesen. Der gängige Aufschluß durch die French-Presse (DOTT, 1977) gewährleistete nicht ausreichend anaerobe Bedingungen; der durch enzymatische Behandlung und osmotischen

Schock (ROST und VENNER, 1965; HUGHES et al., 1971) erforderte zu umfangreiche Vorversuche. Säure, H_2O_2 oder Hitze (CRABEEL und GRENSON, 1970; BECKER und NAIDER, 1977; SERRANO, 1977; NISBET und PAYNE, 1979; BEEZER et al., 1982; EILAM, 1982a; 1982b) konnten ebenfalls nicht angewandt werden, da ein Entweichen als SO_2 oder eine Oxidation des Sulfits befürchtet werden mußte.
Aus diesen Gründen erschien die Permeabilisierung der Zellen mit Nystatin (KOTYK et al., 1971; HAMILTON-MILLER, 1973; BEEZER et al., 1982; EILAM, 1982b) als besser geeignet. Sie ermöglichte eine vergleichsweise einfache Handhabung und außerdem eine Inkubation unter anaeroben Bedingungen.

Zunächst mußte geklärt werden, ob durch die Behandlung mit Nystatin die Zellen tatsächlich für das Sulfit-Molekül durchlässig werden und welche Konzentration und Inkubationsdauer erforderlich sind.
Dazu wurden die Zellen einerseits durch Kochen aufgeschlossen und andererseits zum Vergleich mit 0.1 mM Nystatin behandelt (vgl. 2.9.2.1). Als Vergleichs-Ion wurde das Phosphat-Anion herangezogen, da es dem Sulfit-Anion ähnelt und im Gegensatz zu Sulfit durch Kochen nicht verändert wird.
Es konnte gezeigt werden, daß nach 2.5-stündiger Behandlung mit 0.1 mM Nystatin fast die gleiche Phosphatkonzentration extrahiert werden konnte wie durch Kochen (Abb. 32). Dies spricht dafür, daß in diesem Zeitraum die Membran für Anionen der Größenordnung des Phosphat-Ions durchlässig wird. Dies Ergebnis erlaubt die Anwendung dieser Methode auch für die Bestimmung der intrazellulären Sulfitkonzentration.
Die Behandlung der Zellen mit Nystatin erstreckt sich über den relativ langen Zeitraum von 2.5 Stunden (Abb. 32). Auch der Nystatin-induzierte Aminosäure-Efflux aus Zellen von Saccharomyces cerevisiae erfolgte über eine ähnliche Zeitspanne (BEEZER et al., 1982).
In der Mehrzahl der Parallelversuche lag der durch Kochen erzielte Wert um etwa 10% höher als der der Nystatinbehandlung.

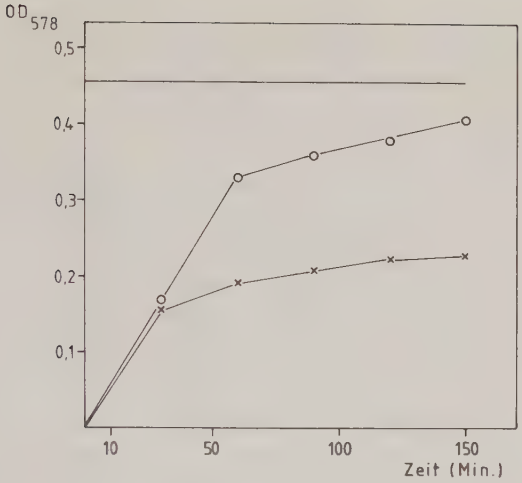

Abb. 32: Aufschluß der Zellen durch 20-minütiges Kochen oder Behandlung der Zellen mit 0.1 mM Nystatin

——gekochter Extrakt, 20 Minuten; o Behandlung mit 0.1 mM Nystatin; x Inkubation in bidestilliertem Wasser; als Maß für den Aufschluß wurde aus den Zellen freigesetztes Phosphat bestimmt.

Die Anzucht der Zellen (Stamm 36) erfolgte unter Standardbedingungen mit 10% Glycerin als Kohlenstoffquelle. Die Durchführung des Versuchs ist unter Methoden (2.9.2) beschrieben.

Die höhere Phosphatkonzentration des gekochten Extraktes ist möglicherweise auf die Freisetzung von Phosphat aus den Adenylaten durch Erhitzen zurückzuführen (COOPER, 1980).
Auch die Kontrolle (Inkubation ohne Nystatin) enthielt Phosphat (Abb. 32). Bei dem nach Suspension in bidestilliertem Wasser gemessenen extrazellulären Phosphat handelt es sich vermutlich um an den Zellen haftendes, durch den Waschvorgang nicht entferntes Phosphat (GOODMAN und ROTHSTEIN, 1957). Ein Efflux von Phosphat dagegen ist eher unwahrscheinlich, da die Hefezellmembran dem Phosphat-Efflux einen hohen Widerstand entgegenbringt und auch durch Waschen kein Phosphat aus der Zelle extrahiert werden kann (COCKBURN et al., 1975; eigene Ergebnisse, nicht dargestellt).

3.2.7.3 Zentrifugation in ein spezifisch dichteres Medium

Durch Waschen der Hefen mit bidestilliertem Wasser wird intrazelluläres Sulfit aus den Zellen extrahiert. Es hatte sich gezeigt, daß bei wiederholtem Waschen stets die gleiche Menge Sulfit im Überstand meßbar war. Auch noch nach dem 10. Waschvorgang konnte extrazelluläres Sulfit in derselben Konzentration nachgewiesen werden wie beim ersten Mal.
Weder die Zugabe von 1% NaCl oder Verwendung von Puffer oder Wachstumsmedium statt Wasser, noch eine Erniedrigung der Temperatur auf 4°C während des Waschvorgangs konnte die Auswaschrate verringern.
Um einen Verlust von intrazellulärem Sulfit beim Waschen zu vermeiden, wurden die Zellen stattdessen in ein spezifisch dichteres Medium zentrifugiert. In Vorversuchen wurde die optimale Glycerinkonzentration ermittelt (vgl. 2.9.1). Dabei erwies sich eine 30%ige Glycerinlösung als am besten geeignet.

3.2.7.4 Vergleich der intra- und extrazellulären Sulfitkonzentration

Zum Vergleich der intra- und extrazellulären Sulfitkonzentration (Tab. 7) wurden die Hefen aus den erläuterten Gründen (vgl. 3.2.7.1) mit 10% Glycerin als Kohlenstoffquelle bei pH 4.0 angezogen.
Zur Bestimmung der extrazellulären Sulfitkonzentration wurde der Sulfitgehalt in der Kulturflüssigkeit gemessen. Die Ermittlung der intrazellulären Sulfitkonzentration erfolgte anschließend nach Trennung der Zellen vom Wachstumsmedium (Zentrifugation in eine 30%ige Glycerinlösung) und Permeabilisierung durch Nystatin unter anaeroben Bedingungen. Die durch die Nystatin-Behandlung extrahierte Menge Sulfit entsprach der intrazellulären Sulfitkonzentration. Die experimentellen Einzelheiten zu diesem Versuch sind in Kapitel 2.9.2.2 beschrieben.

Tab. 7: Vergleich der intra- und extrazellulären Sulfitkonzentration und Verteilung der molekularen Formen des Sulfits innerhalb und außerhalb der Zelle

	pH-Wert	freies Sulfit (mM)	Verteilung der molekularen Formen			gebundenes Sulfit (mM)
				%++	(mM)	
intrazellulär	6.0+	0.6	SO_2	0.006	0.000036	1.67
			HSO_3^-	83.68	0.502	
			$SO_3^=$	16.31	0.098	
extrazellulär	3.8	0.18	SO_2	1.01	0.0018	0.2
			HSO_3^-	98.91	0.178	
			$SO_3^=$	0.07	0.00013	

Die experimentellen Einzelheiten zu diesem Versuch (Stamm 36) sind unter 2.9.2.2 beschrieben.

+ Es wurde der von KOTYK (1963), RYAN und RYAN (1972), BORST-PAUWELS (1981), SLAVIK (1981) und KOTYK et al. (1982b) bestimmte intrazelluläre pH-Wert zugrunde gelegt.

++ Die prozentuale Verteilung der molekularen Formen wurden von MACRIS (1972) übernommen.

Vergleicht man die Konzentration der molekularen Formen des Sulfits innerhalb und außerhalb der Zelle, kann man einen Sulfit-Efflux durch einfache SO_2-Diffusion ausschließen; denn die extrazelluläre SO_2-Konzentration ist höher als die intrazelluläre. Auch die zu fordernde 100-fach höhere intrazelluläre Gesamtsulfit-Konzentration (vgl. 3.2.7) konnte nicht nachgewiesen werden. Der Unterschied macht nur einen Faktor von 3 aus.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann ein Sulfit-Efflux in Form von SO_2 mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Anders liegen die Verhältnisse beim HSO_3^- - und $SO_3^=$ - Anion. In beiden Fällen wurde eine höhere intrazelluläre Konzentration gemessen, so daß ein passiver, katalysierter Transport von Sulfit als Anion wahrscheinlich ist.

In der Versuchsreihe wurde gleichzeitig auch die Konzentration von gebundenem Sulfit innerhalb und außerhalb der Zellen ermittelt (Tab. 7). Ein Sulfit-Transport aus der Zelle in dieser Form ist aufgrund der gegebenen Konzentrationsverhältnisse möglich. Unter günstigeren Wachstumsbedingungen jedoch, z.B. mit Glucose als Kohlenstoffquelle, lassen sich bis zu 7 mM gebundenes Sulfit im Medium nachweisen (Abb. 28), während die intrazelluläre Konzentration dem in Tab. 7 angegebenen Wert (1.67 mM) entspricht (Ergebnis nicht dargestellt). Ein passiver Transport kann unter diesen Bedingungen nicht mehr stattfinden, da die intrazelluläre Konzentration niedriger als die extrazelluläre ist.

Ein Sulfit-Efflux in gebundener Form kann also ebenfalls ausgeschlossen werden.

3.2.8 Ladungskompensation

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, daß Sulfit als Anion die Membran durchquert. Der Transport als geladenes Molekül erfordert eine Ladungskompensation. Folgende Ionen kommen dafür in Betracht:

3.2.8.1 Protonen

Bei einer Beteiligung von Protonen am Sulfit-Efflux ist ein Einfluß des extrazellulären pH-Wertes zu erwarten. Daher wurde in den folgenden Versuchen die Wirkung der Wasserstoffionenkonzentration des Inkubationspuffers auf den Efflux untersucht.

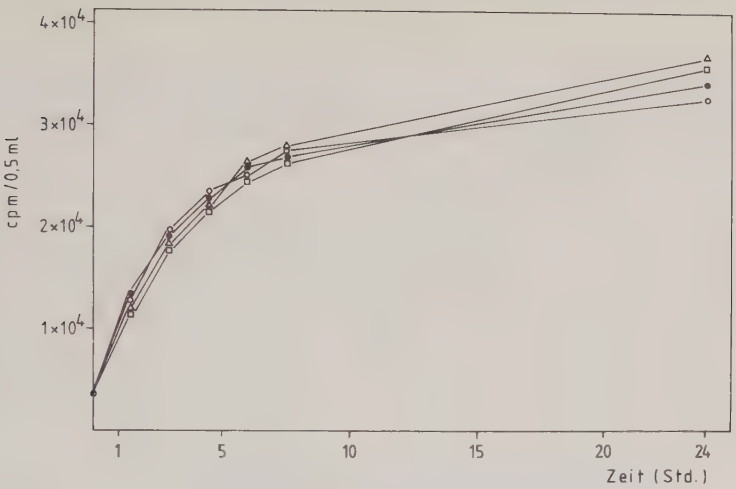

Abb. 33: Einfluß des extrazellulären pH-Wertes auf den Sulfit-Efflux

o pH 3.0; ● pH 4.0; △ pH 5.0; □ pH 6.0.

Die Durchführung des Versuchs (Stamm 36) erfolgte wie in Methoden (2.7.2.1) beschrieben. Als Inkubationspuffer diente 50 mM Citrat-Puffer verschiedener pH-Werte.

Abb. 33 macht deutlich, daß der extrazelluläre pH-Wert die ausgeschiedene Menge an radioaktiv markiertem Sulfit in keiner Weise beeinflußt.

Da - vor allem bei niedrigem pH-Wert - ein Entweichen von gasförmigen SO_2 bei der gewählten Meßtechnik (Zunahme der Radioaktivität im Überstand) nicht ausgeschlossen werden und dies möglicherweise das Ergebnis verfälschen konnte, wurde der Versuch in anderer Form wiederholt. Diesmal erfolgte die Messung des Efflux durch Bestimmung der Abnahme der intrazellulären Radioaktivität. Auch unter diesen Bedingungen ist kein Einfluß des pH-Wertes auf den Efflux nachzuweisen (Tab. 8).

Die Versuchsergebnisse machen deutlich, daß Protonen nicht für eine Ladungskompensation des Sulfit-Efflux verantwortlich sind.

Tab. 8: Abnahme der intrazellulären Radioaktivität während des Sulfit-Efflux in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffers

Zeit (Std.)	intrazelluläre Radioaktivität (cpm pro 0.5 ml Suspension)				
	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0
0	53333	62365	59914	55277	57214
4.5	33723	40673	38683	36039	36401
24.0	22004	35729	27254	24506	26991
	Abnahme der intrazellulären Radioaktivität (cpm)				
0-4.5	19610	21692	21231	19238	20813
0-24.0	31329	26636	32660	30771	30223

Durchführung des Versuchs (Stamm 36) wie in Methoden (2.7.3) beschrieben; verwendete Puffer: pH 3.0-6.0 Citrat, 50 mM; pH 7.0 Tris-HCl, 50 mM.

3.2.8.2 Anionen

Falls die Elektroneutralität durch ein Anion gewährleistet würde, müßte dieses aus dem Inkubationsmedium aufgenommen werden. In diesem Fall dürfte in bidestilliertem Wasser kein oder nur ein geringer Efflux zu messen sein.
Wie aus Abb. 34 hervorgeht, wird der Efflux jedoch durch die Zusammensetzung des Inkubationsmediums in keiner Weise beeinflußt. Auch in bidestilliertem Wasser findet ein ungehinderter Sulfit-Transport statt.

Damit kann auch die Aufnahme von Anionen zur Ladungskompensation ausgeschlossen werden.

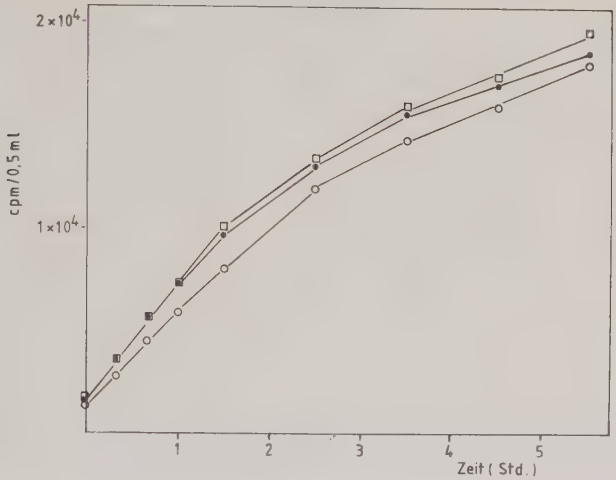

Abb. 34: Einfluß des Inkubationsmediums auf den Sulfit-Efflux (Stamm 36)

o anaerobes Medium; □ Citrat-Puffer, 50 mM, pH 5.0;
● bidestilliertes Wasser.

3.2.8.3 Natrium- und Kaliumionen

Bei Wachstum mit Methionin als einziger Schwefelquelle wird auch durch Sulfit bildende Hefen kein Sulfit produziert (Tab. 9 und 10). Daher ist es möglich, durch Anzucht auf verschiedenen Schwefelquellen, Zellen desselben Stammes mit und ohne Sulfitproduktion zu erhalten.
Um eine eventuelle Korrelation zwischen Sulfit- und Kationen-Efflux nachzuweisen, wurden die Hefen daher einerseits mit Sulfat, andererseits mit Methionin als Schwefelquelle kultiviert. Zusätzlich wurde der Kationen-Efflux eines Normalstammes dem des entsprechenden Sulfitbildners gegenübergestellt. Der Normalstamm weist auch bei Wachstum auf Sulfat nur eine geringe Sulfitbildung auf (Tab. 11).

Tab. 9: Beziehung zwischen Kationen- und Sulfit-Efflux

	Kationen- und Sulfit-Efflux nach Anzucht mit					Sulfit-bedingter K^+ - Efflux
	7.5 mM Sulfat			1.5 mM Methionin		
Zeit (Std.)	Sulfit (µM)	K_1^+ (µM)	Na^+ (µM)	Sulfit (µM)	K_2^+ (µM)	$K_1^+ - K_2^+$ (µM)
0	32.5	89.9	5.8	0	32.5	57.4
1.5	56.3	160.8	5.2	0	99.4	61.4
2.5	65.0	192.2	6.4	0	148.2	44.0
3.5	71.9	220.4	7.4	0	155.6	64.8

Die Messung des Efflux (Stamm 27) erfolgte in bidestilliertem Wasser (vgl. 2.7.2.1); die Zellsuspension enthielt 1.5 mg TG/ml; zu den angegebenen Zeiten wurden die extrazellulären Konzentrationen an Sulfit, K^+ und Na^+ bestimmt.

Tab. 10: Beziehung zwischen Kalium- und Sulfit-Efflux

	Kalium- und Sulfit-Efflux nach Anzucht mit				Sulfit-bedingter K^+ - Efflux
	7.5 mM Sulfat		1.5 mM Methionin		
Zeit (Std.)	Sulfit (µM)	K_1^+ (µM)	Sulfit (µM)	K_2^+ (µM)	$K_1^+ - K_2^+$ (µM)
0	20.0	61.8	0	39.5	22.3
1.5	53.0	115.6	0	53.9	61.7
2.5	75.7	151.2	0	63.1	88.1
3.5	122.5	210.7	0	67.9	142.8

Messung des Efflux (Stamm 36) in bidestilliertem Wasser (vgl. 2.7.2.1); die Zellsuspension enthielt 1.8 mg TG/ml; zu den angegebenen Zeiten wurden die extrazellulären Konzentrationen an Sulfit, K^+ und Na^+ bestimmt.

Tab. 11: Beziehung zwischen Kationen- und Sulfit-Efflux

	Kation- und Sulfit-Efflux nach Anzucht mit					Sulfit-bedingter K^+ - Efflux
	7.5 mM Sulfat (Stamm V 102515)			1.5 mM Methionin (Stamm 36)		
Zeit (Std.)	Sulfit (µM)	K_1^+ (µM)	Na^+ (µM)	Sulfit (µM)	K_2^+ (µM)	$K_1^+ - K_2^+$ (µM)
0	5.9	28.8	3.6	0	39.5	-
1.5	17.9	82.9	1.7	0	53.9	29.0
2.5	27.7	90.5	1.8	0	63.1	27.4
3.5	35.9	100.9	1.9	0	67.9	33.0

Messung des Efflux in bidestilliertem Wasser (vgl. 2.7.2.1); die Zellsuspension enthielt 1.9 mg TG/ml (Stamm V102515) und 1.8 mg TG/ml (Stamm 36). Zu den angegebenen Zeiten wurden die extrazellulären Konzentrationen an Sulfit, K^+ und Na^+ bestimmt.

\+ Die Meßdaten wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit aus Tab. 10 übernommen.

Die Messung des Efflux für diese Versuchsreihe erfolgte in bidestilliertem Wasser, da nur unter diesen Bedingungen die Kationenkonzentration exakt bestimmt werden konnte (vgl. 2.7.2.1). Der vorhergehende Versuch hatte gezeigt (Abb. 34), daß der Sulfit-Efflux durch Suspension der Zellen in Wasser nicht beeinflußt wird.

Der Na^+ - Efflux reicht nicht aus, um den Sulfit-Efflux zu kompensieren (Tab. 9 und 11).

Anders liegen die Verhältnisse jedoch im Falle der Kalium-Ionen. Unabhängig von der gewählten Schwefelquelle scheiden die Hefen Kalium aus (Tab. 9 und 10). Die sulfitbildenden Zellen (Wachstum mit Sulfat als Schwefelquelle) weisen einen höheren Kalium-Efflux auf als die Zellen ohne Sulfitproduktion (Wachstum mit Methionin).

Der erhöhte Kalium-Efflux entspricht der Menge des ausgeschiedenen Sulfits. Die Stöchiometrie von 1 : 1 (µmol Sulfit : µmol Kalium) deutet darauf hin, daß das HSO_3^- - Anion transportiert wird.
Entsprechende Ergebnisse ergaben sich bei der Untersuchung des Normalstammes (Tab. 11). Er produziert bei Wachstum auf Sulfat geringe Mengen Sulfits, scheidet jedoch mehr Kalium aus, als der entsprechende Sulfitbildner (Stamm 36) unter nicht sulfitbildenden Bedingungen, d.h. bei Kultivierung mit Methionin. Auch in diesem Fall entspricht der erhöhte Kalium-Efflux der Menge des ausgeschiedenen Sulfits.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Ladungskompensation des Sulfit-Efflux durch Kalium sehr wahrscheinlich.

3.2.8.4 Handelt es sich um einen K^+ / Sulfit-Symport?

Es konnte gezeigt werden, daß der Sulfit-Efflux von einem Kalium-Efflux begleitet wird. In diesem Fall sind zwei Möglichkeiten für den Mechanismus des Efflux denkbar:
(1) K^+ / Sulfit-Symport
(2) Elektrogener Sulfit-Efflux und Ladungskompensation durch einen unabhängigen Kalium-Träger
Beim Vorliegen eines Symports von Kalium und Sulfit ist zu fordern, daß Kalium im Medium zu einer Hemmung des Efflux führt. Daher wurde der Einfluß verschiedener KCl-Konzentrationen auf den Efflux untersucht.

Man erkennt (Tab. 12), daß extrazelluläres Kalium den Sulfit-Transport nicht beeinflußt. Selbst wenn man die extrazelluläre Kalium-Konzentration der intrazellulären von 150 - 200 mM (ROTHSTEIN, 1974; OKOROKOV, 1980) angleicht, kann kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden.

Ein K^+/Sulfit-Symport kann aufgrund dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Tab. 12: Beziehung zwischen Sulfit-Efflux und extrazellulärer Kalium-Konzentration

Zeit (Minuten)	cpm pro 0.5 ml des Überstands			
	Kontrolle	10 mM KCl	Kontrolle	200 mM KCl
0	1507	1474	1693	1720
5	2325	2361	2224	2230
10	3115	3226	2923	2938
15	3933	3852	3278	3267
20	4967	4946	3878	3910
25	5809	5649	4569	4646
30	6732	6581	5138	5217
35	n.b.	n.b.	5854	5885

Die Messung des Efflux (Stamm 36) erfolgte unter Standardbedingungen (vgl. 2.7.2.2) unter Zusatz der angegebenen KCl-Konzentrationen.
Als Kontrolle diente der Efflux in Puffer ohne Zusatz.

3.2.9 Welche intrazelluläre Verbindung ist für den Sulfit-Efflux verantwortlich?

Die vorausgegangenen Experimente haben gezeigt (Tab. 7), daß die intrazelluläre Sulfitkonzentration zu gering ist, um den 24-stündigen Efflux bei Inkubation ohne externe Schwefelquelle (Abb. 13) zu bewirken.
Daher liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei der intrazellulären Verbindung um Sulfat oder um eine Zwischenverbindung des assimilatorischen Schwefelstoffwechsels handelt.
Für die Versuche zur Identifizierung der Verbindung, die intrazellulär in ausreichend hohem Maße vorhanden ist, um den 24-stündigen Sulfit-Efflux zu ermöglichen, erfolgte die Anzucht der Hefen mit ^{35}S-Sulfat. Die radioaktive Markierung wurde gegenüber dem Standard (vgl. 2.7.2.2) nicht erhöht, da man davon ausgehen kann, daß die gesuchte Verbindung in hohen Konzentrationen vorliegt.

Der Zellaufschluß erfolgte aus den schon genannten Gründen (vgl. 3.2.7.2) mit 0.1 mM Nystatin. Die experimentellen Einzelheiten zu diesem Versuch sind in Kapitel 2.10.2 beschrieben.
Zum Vergleich wurde der Normalstamm V 102515 unter den gleichen Bedingungen untersucht.

3.2.9.1. Qualitative Analyse der intrazellulären Schwefelverbindungen

Die radioaktiv markierten Zellextrakte wurden einer dünnschichtchromatographischen Trennung unterzogen, da mit dieser Methode alle in Frage kommenden Verbindungen, wie Sulfat und die Zwischenverbindungen der Sulfatreduktion, nachgewiesen werden konnten.

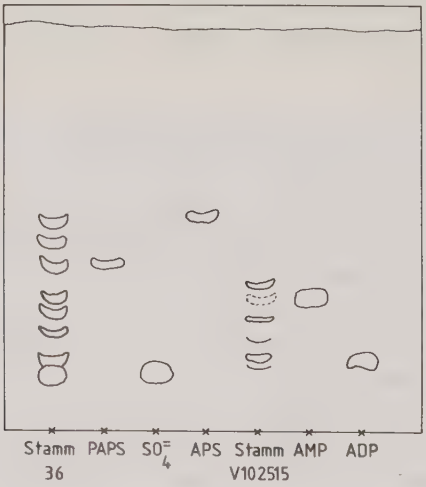

Abb. 35: Dünnschichtchromatographische Trennung der Zellextrakte nach Anzucht mit $^{35}SO_4^=$

Die experimentellen Einzelheiten zu diesem Versuch sind unter 2.10 beschrieben. Je 10 µl der Extrakte und der Referenzverbindungen wurden auf die Chromatographieplatten aufgetragen.

Die Auswertung des Chromatogramms erfolgte unter UV-Licht (Nachweis von Adenylaten), durch Sprühreagenzien (Nachweis des Sulfats) und durch Lokalisation der Radioaktivität mit Hilfe eines Dünnschichtscanners.

Bei dem sulfitbildenden Stamm 36 waren im UV-Licht u.a. Flecke sichtbar, deren R_f-Werte denen des APS und des PAPS entsprachen (Abb. 35). Auch Sulfat war nach dem Sprühen der Platte nachzuweisen. Beim Scannen zeigte sich, daß der überwiegende Teil der Radioaktivität im Sulfatfleck konzentriert war. Ein geringer Teil wurde am Startfleck sowie auf der Höhe des APS und des PAPS lokalisiert. Eine quantitative Bestimmung der einzelnen Verbindungen konnte aufgrund der dünnschichtchromatographischen Trennung nicht durchgeführt werden.

Bei dem Normalstamm V 102515 war die insgesamt extrahierte Radioaktivität wesentlich geringer (20 - 30%) als bei dem sulfitbildenden Stamm.
Auf den Chromatographie-Platten waren die Adenylate APS und PAPS nicht zu erkennen (Abb. 35). Sulfat konnte weder durch das Sprühreagenz noch radioaktiv nachgewiesen werden. Die Radioaktivität war vor allem am Startfleck und in der oberen Hälfte der Lauffläche lokalisiert.

3.2.9.2 Quantitative Analyse der intrazellulären Schwefelverbindungen

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen hatten gezeigt, daß der sulfitbildende Stamm im Gegensatz zum Normalstamm Sulfat in hohen Konzentrationen enthält. Durch diese Methode war es jedoch weder möglich, Sulfat und Sulfit von einander zu trennen (vgl. 2.6.7), noch die intrazellulären Verbindungen quantitativ zu analysieren. Die Messung der ausgekratzten radioaktiven Flecke ergab zu stark schwankende Werte.

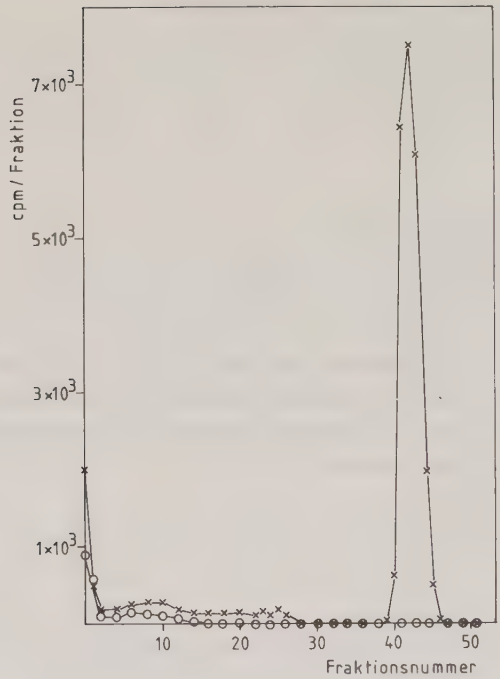

Abb. 36: Hochspannungselektrophoretische Trennung der Zellextrakte nach Anzucht mit $^{35}SO_4^{=}$

x Stamm 36; o Stamm V102515

Folgende Substanzen wurden durch Referenzverbindungen identifiziert: APS (Fraktion 16-18); PAPS (Fraktion 22-27); Sulfat (Fraktion 40-46).

Experimentelle Einzelheiten zu diesem Versuch siehe Text und Methoden (2.10).

Daher wurden die Extrakte einer Hochspannungselektrophorese unterworfen, wodurch eine deutliche Trennung der einzelnen Verbindungen möglich ist (COOPER, 1980). Zur quantitativen Analyse wurde das Filterpapier in Streifen geschnitten und im Szintillationszähler ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abb. 36 und Tab. 13 dargestellt.

Tab. 13: Prozentuale Verteilung der intrazellulären Radioaktivität nach hochspannungselektrophoretischer Trennung

	Stamm 36		Stamm V 102515	
Radioaktivität	(cpm)	(%)	(cpm)	(%)
Gesamtradioaktivität	30 590	100	4 645	100
APS	488	1.6	-	-
PAPS	822	2.7	-	-
$SO_4^{=}$	23 043	75.3	-	-
Startfleck	2 694	8.8	1 576	33.9
übrige Fraktionen	3 543	11.6	3 069	66.1

Es wurde die elektrophoretische Trennung aus Abb. 36 zugrunde gelegt.

Man erkennt deutlich, daß nur Sulfat in hohem Maße (75.3% der Gesamtradioaktivität) vorhanden ist. Auch bei Anwendung dieser Meßmethode ist in Extrakten aus dem Normalstamm kein Sulfat nachweisbar. Die Konzentration von APS und PAPS ist bei dem sulfitbildenden Stamm gegenüber dem Normalstamm erhöht.
Vor Auftragung auf das Filterpapier mußte der Extrakt gekocht werden, um einen klaren Überstand zu erhalten. Dies führte zwangsläufig dazu, daß das vorhandene Sulfit zu Sulfat oxidiert wurde. Um trotzdem eine Bestimmung durchzuführen, wurde ungekochter Extrakt in Convey-Schalen angesäuert (vgl. 2.10.3) und die freigesetzte Radioaktivität, d.h. das vorhandene Sulfit als $^{35}SO_2$, bestimmt. Die Differenz zwischen diesem Meßwert und der Gesamtradioaktivität des Sulfat-Flecks (Abb. 36) ergab die tatsächliche Sulfatkonzentration.

3.2.9.3 Vergleich zwischen intrazellulärer Sulfatkonzentration und der Menge des ausgeschiedenen Sulfits

Die Analyse der intrazellulären Schwefelverbindungen hatte deutlich gemacht, daß allein Sulfat in hohen Konzentrationen in den Zellen vorhanden ist (Abb. 36, Tab. 13).
In einer weiteren Versuchsreihe sollte geklärt werden, ob die intrazellulär nachgewiesene Sulfatkonzentration ausreicht, um den gemessenen Sulfit-Efflux zu ermöglichen.
Daher wurden die Kulturen vor der Extraktion geteilt. Die eine Hälfte diente der Bestimmung der intrazellulären Schwefelverbindungen wie unter 3.2.9.2 beschrieben, bei der anderen Hälfte wurde der Efflux unter Standardbedingungen verfolgt.

Tab. 14: Vergleich zwischen intrazellulärer Sulfatkonzentration und der Menge des ausgeschiedenen Sulfits

I	II	III	IV
Sulfit (mM) extrazellulär (experimentell ermittelt)	Sulfat (mM) intrazellulär (theoretisch zu fordern)	Sulfat (mM) intrazellulär (experimentell ermittelt)	Sulfit (mM) intrazellulär (experimentell ermittelt)
0.34	29.8	26.8	0.64

Durchführung (Stamm 36) siehe Text und Methoden (2.10).

Anhand der gemessenen extrazellulären Sulfitkonzentration (Tab. 14, Spalte I) wurde die intrazelluläre Sulfatkonzentration berechnet, die nötig wäre, um den gemessenen Efflux zu ermöglichen (Tab. 14, Spalte II). Als intrazelluläres Volumen der Zellen wurde ein Wert von 3.1 µl/mg Trockengewicht (GANCEDO und GANCEDO, 1973; PERL et al., 1976) zugrunde gelegt. Die im Parallelansatz bestimmte, tatsächliche intrazelluläre Sulfatkon-

zentration (Tab. 14, Spalte III) liegt im Bereich des theoretisch zu fordernden Wertes. Die intrazelluläre Sulfit-Konzentration (Tab. 14, Spalte IV) stimmt mit dem chemisch-analytisch ermittelten Ergebnis (Tab. 7) überein.

Der Nachweis, daß es sich bei der intrazellulären Verbindung, die den 24-stündigen Efflux ermöglicht, um Sulfat handelt, bestätigt die Interpretation der Versuchsergebnisse, die den Stoffwechsel mit in die Betrachtung einbeziehen. Dies gilt z.B. für die Untersuchungen zum Einfluß von Transporthemmstoffen (Abb. 18-22), von IAA (Abb. 23), von SO_2 (Abb. 27 und 28), von Metallionen und zum Nachweis eines möglichen Transmembraneffekts (Tab. 5; Abb. 15 und 16). Außerdem stützt die Bestimmung der vorherrschenden intrazellulären Schwefelverbindung die Beobachtung, daß der Stoffwechsel der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Sulfit-Efflux sein muß (Abb. 24).

4. Diskussion

Die Hefezellmembran vermittelt die Stoffaufnahme aus dem Nährmedium durch verschiedene Transportsysteme. Je nach Substrat erfolgt dies durch einfache, nicht katalysierte Diffusion, Trägertransport oder Gruppentranslokation (KOTYK, 1980).
Bei der Mehrzahl der Transportsysteme handelt es sich um einen trägervermittelten Transport, d.h. Transport durch in der Membran lokalisierte Proteine. Diese Transportvorgänge weisen Eigenschaften auf, die auch für enzymkatalysierte Reaktionen charakteristisch sind, wie z.B. Sättigungskinetik, Substratspezifität und kompetitive Hemmbarkeit durch chemisch ähnliche Substrate.
In vielen Fällen hat sich gezeigt, daß derselbe Membranträger in der Lage ist, verschiedene Substrate zu translozieren, wenn diese chemisch ähnlich aufgebaut sind. Bei Hefen wurde dies beispielsweise für Aminosäuren (KOTYK et al., 1971; HORÁK und ŘÍHOVÁ, 1982), Purine und Pyrimidine (FORÊT et al., 1978), Peptide (BECKER und NAIDER, 1977; NISBET und PAYNE, 1979), Zucker (HEREDIA et al., 1968; CIRILLO, 1968; KUO et al., 1970; FUHRMANN et al., 1976), Anionen (FELS und CHELDERLIN, 1949) und Kationen (ROTHSTEIN, 1974; DUBOIS und GRENSON, 1979; EILAM, 1982a) nachgewiesen.
Andererseits existieren oft mehrere Transport-Systeme für die Aufnahme desselben Stoffes. Als Beispiel für diesen Fall sind Ammonium (DUBOIS und GRENSON, 1979), Cytosin und Uracil (JUND et al., 1977; FORÊT et al., 1977; LOSSON et al., 1978), Zucker (HEREDIA et al., 1968, KUO et al., 1970), Aminosäuren (KOTYK et al., 1971) und Phosphat (ROOMANS et al., 1977) zu nennen.
Auch im Hinblick auf Influx (Substrataufnahme) und Efflux (Transport aus der Zelle) weisen die verschiedenen Transportsysteme der Hefen deutliche Unterschiede auf. Der Transport kann über verschiedene Träger für Influx und Efflux erfolgen, wie im Falle von Biotin (BECKER und LICHSTEIN, 1972), Riboflavin (PERL et al., 1976), Prolin (HORÁK und ŘÍHOVÁ, 1982) und Uracil (JUND et al., 1977), kann aber auch durch denselben Träger in der Membran vermittelt werden, wie es beispielsweise für Mono-

saccharide und Polyalkohole nachgewiesen wurde (HÖFER, 1970; HAŠKOVEC und KOTYK, 1973; KLÖPPEL und HÖFER, 1976; FUHRMANN et al., 1976; VAN DEN BROEK et al., 1982).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Sulfit-Transport aus sulfitproduzierenden Weinhefen zu untersuchen. Die kurze Übersicht über die Vielseitigkeit der Transportsysteme der Hefezellmembran macht deutlich, daß für die Charakterisierung eines Transportsystems alle theoretischen Möglichkeiten (einfache und erleichterte Diffusion, Energieabhängigkeit, gleicher oder unterschiedliche Träger für Influx und Efflux) überprüft werden müssen.

4.1 Einfluß von Sulfit auf die Sulfataufnahme

Erste Hinweise zum Sulfit-Transport bei Pilzen, Bakterien und Algen ergaben sich aus Untersuchungen zum Transport anderer Anionen der Gruppe VI des Periodensystems. Durch Konkurrenzexperimente und Einsatz von transportdefekten Mutanten konnte gezeigt werden, daß Substratanaloga des Sulfats, wie z.B. Chromat, Selenat, Molybdat und Thiosulfat über den Sulfat-Träger in die Zellen aufgenommen werden. Auch im Falle des Sulfits ist aufgrund der experimentellen Hinweise ein solcher Transportweg in Erwägung zu ziehen (vgl. 1.3).
Außerdem wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen, daß der Sulfat-Träger auch zu einem Sulfat-Efflux im Austausch gegen seine Substratanaloga befähigt ist (DREYFUSS, 1964; DREYFUSS und PARDEE, 1966; YAMAMOTO und SEGEL, 1966; CUPPOLETTI und SEGEL, 1974; MARZLUF, 1974). Das Phänomen, daß strukturell ähnliche Verbindungen durch dasselbe Transportsystem transportiert werden, ist auch für Nitrat und Nitrit nachgewiesen (CRESSWELL und SYRETT, 1982; BOOGERD et al., 1983).

Es war naheliegend, zunächst zu untersuchen, ob der Transport zweier chemisch analoger Substrate (Sulfat und Sulfit) über denselben Träger in der Membran erfolgt (HEINZEL, 1978).
Der Nachweis für die Existenz eines gemeinsamen Trägers für den Influx von Sulfat und Sulfit sagt zwar noch nichts über den Mechanismus des Efflux aus, wäre aber ein erster Hinweis auf die Möglichkeit eines Sulfit-Efflux über das Sulfat-Transportsystem. Daher wurde zunächst die Sulfataufnahme im Hinblick auf den Einfluß von Sulfit untersucht.

Die Sulfataufnahme bei Hefen wird übereinstimmend von allen Autoren bei niedrigen Substratkonzentrationen (bis 0.5 mM) durch eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben (KOTYK, 1959; MAW, 1963a; ROOMANS et al., 1979). BRETON und SURDIN-KERJAN (1977) konnten für Saccharomyces cerevisiae Abweichungen von diesem Verhalten nachweisen. Aufgrund des biphasigen Verlaufs des Diagramms nach LINEWEAVER-BURK (1934) vermuten die Autoren zwei Transportwege für Sulfat, ein hochaffines System, das bereits im Konzentrationsbereich bis 0.5 mM Sulfat aktiv ist, und ein weiteres System, das bei hohen Sulfatkonzentrationen aktiv wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Sulfat-Transport sowie die Messungen von KOTYK (1959), McCREADY und DIN (1974) und ROOMANS et al. (1979) beschäftigen sich mit dem affinen System im Konzentrationsbereich bis 0.5 mM. Diese experimentellen Daten schließen nicht die Existenz eines zusätzlichen Mechanismus aus, der bei hohen Sulfatkonzentrationen aktiv ist, wie er von BRETON und SURDIN-KERJAN (1977) postuliert wurde. Die Autoren können jedoch experimentell nicht eindeutig feststellen, ob die beiden Transportsysteme unabhängig voneinander arbeiten, oder ob es sich um ein Membranprotein handelt, das in zwei Konformationen mit unterschiedlicher Affinität zum Substrat vorkommt.
Auch bei den hier untersuchten Hefen wird in dem gewählten Konzentrationsbereich zwischen 0.01 mM und 0.5 mM die Beziehung zwischen Sulfataufnahme und extrazellulärer Sulfatkonzentration durch eine Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben (Abb. 8 u. 9).

Die K_T - Werte von 0.071 mM (Stamm 36) und 0.065 mM (Stamm 27) liegen im Rahmen der von anderen Autoren bei Hefen gemessenen Werte (BORST-PAUWELS, 1981; KEENAN et al., 1982).

Ein Charakteristikum der meisten Sulfat-Transportsysteme ist, daß die Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme mit der Inkubationsdauer ohne externe Schwefelquelle zunimmt. Dies gilt nicht nur für Hefen (KLEINZELLER et al., 1959; ROOMANS et al., 1979), sondern auch für andere Mikroorganismen (DREYFUSS und PARDEE, 1966; VALLEE und JEANJEAN, 1968b; BRADFIELD et al., 1970; DEANE und O'BRIEN, 1975; CUHEL et al., 1981). Eine Ausnahme bilden die Untersuchungen von HORÁK und Mitarbeitern (1981) an Stämmen von Saccharomyces cerevisiae.
Es zeigte sich, daß bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stämmen während der Schwefel-Aushungerungsperiode eine Steigerung der Sulfataufnahme um das 5- bzw. 16-fache verzeichnet werden konnte (Abb. 4).
Dies Phänomen ist auf eine Regulation der Sulfataufnahme durch intrazelluläre Schwefelverbindungen zurückzuführen, deren Konzentration während der Aushungerungszeit sinkt. Die Mehrzahl der Autoren führt diese Regulation auf zwei Mechanismen zurück. Sie erfolgt sowohl auf der Ebene der de novo-Synthese des Sulfat-bindenden bzw. -transportierenden Systems (Derepression) als auch auf dem Niveau der Veränderung der katalytischen Aktivität durch einen intrazellulären Inhibitor (DREYFUSS und PARDEE, 1966; YAMAMOTO und SEGEL, 1966; BRADFIELD et al., 1970; MARZLUF, 1975; PASSERA und FERRARI, 1975; CUHEL et al., 1981),
Bei Hefen konnten BRETON und SURDIN-KERJAN (1977) zeigen, daß das Sulfat-Molekül selbst, möglicherweise aber auch Zwischenverbindungen der Sulfatassimilation, wie z.B. APS, für die Regulation der Sulfataufnahme verantwortlich sind. Gleichzeitig unterliegt die Sulfataufnahme bei Hefen auch einer Regulation durch die Schwefel enthaltenden Aminosäuren Methionin und Cystein (KLEINZELLER et al., 1959; MAW, 1963a; MINÁRIK und NAVARA, 1973; DOTT et al., 1977), so daß auch eine intrazelluläre Abnahme dieser Substanzen

während der Aushungerungszeit für den regulatorischen Effekt verantwortlich sein könnte, wie es für Salmonella typhimurium (DREYFUSS, 1964), für Penicillium chrysogenum (YAMAMOTO und SEGEL, 1966) und Monochrysis lutheri (DEANE und O'BRIEN, 1975) gezeigt werden konnte.

Nach Inkubation stationärer Hefezellen in Wasser verlieren diese die Fähigkeit, Sulfat aufzunehmen (70% innerhalb einer Stunde). Durch Zugabe einer Kohlenstoffquelle wird die Maximalgeschwindigkeit der Aufnahme wieder erhöht (HORÁK et al., 1981; KOTYK et al., 1982a). Diese Stimulation ist an eine funktionierende Proteinsynthese gekoppelt. Daher führen die Autoren die Glucose bedingte Stimulation auf eine de novo-Synthese des Transportsystems zurück.
Auch die hier untersuchten Hefen sind nach Inkubation in Puffer oder Wasser nicht mehr in der Lage, Sulfat aufzunehmen (vgl. 3.1.2). Die Zugabe von Glucose und Ammonium-Ionen während dieser Periode führt dagegen zu der gleichen Aufnahmerate wie in der Kontrolle (komplettes Medium).
Andere Autoren wiesen eine Abhängigkeit der Sulfataufnahme der Hefen von der Anwesenheit einer Stickstoffquelle nach (KOTYK, 1959; KLEINZELLER et al., 1959; CROCOMO und MENARD, 1962; MAW, 1963b; KOTYK et al., 1982a). Durch die Annahme einer kontinuierlichen Neu-Synthese des Transportproteins während der Inkubationszeit läßt sich die Abhängigkeit von Kohlen- und Stickstoffquelle erklären.
Ungewöhnlich sind in diesem Zusammenhang wiederum die Ergebnisse von HORÁK und Mitarbeitern (1981). Im Gegensatz zu allen anderen Autoren weisen sie eine Hemmung der Sulfataufnahme nach Präinkubation mit Ammonium-Ionen nach.

Um möglichst optimale Bedingungen für die Untersuchungen zum Einfluß von Sulfit auf die Sulfataufnahme zu ermitteln, wurde versucht, die Sulfataufnahme in Wasser bzw. Puffer zu messen

(Tab. 2), da in diesen Fällen mögliche Reaktionen des Sulfits mit dem Inkubationsmedium weitgehend ausgeschlossen werden können.
Tab. 2 macht deutlich, daß die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hefen in Wasser oder Puffer allein Sulfat nicht aufnehmen können. Offensichtlich ist die Sulfataufnahme von einer oder von mehreren Komponenten des Wachstumsmediums abhängig. Dies geht zusätzlich aus Tab. 1 hervor, die zeigt, daß die Verdünnung des kompletten Mediums zu einer deutlichen Verringerung der Sulfataufnahme führt.
Die hier untersuchten Hefestämme unterscheiden sich im Hinblick auf den Einfluß von Energiequellen im Inkubationsmedium deutlich von anderen Stämmen. Auch nach Zusatz von Glucose oder Fructose findet kein Transport statt, während bei anderen Stämmen eine deutliche Aufnahmesteigerung gegenüber der Messung in Wasser oder Medium ohne Glucose zu verzeichnen ist (KLEINZELLER et al., 1959; MAW, 1963a, McCREADY und DIN, 1974). ROOMANS et al., (1979) und HORÁK et al. (1981) führen ihre Messungen zum Sulfat-Transport in Puffer bzw. Wasser plus Glucose durch.
Tab. 2 zeigt, daß in einem Testansatz, der Ammonium-Phosphat-Puffer und Glucose enthält, kein Unterschied zur Aufnahme in komplettem Medium besteht. Sowohl eine Energiequelle als auch die Anwesenheit von Ammonium-Ionen sind offenbar Voraussetzung für den Transport von Sulfat in der Zelle.
KLEINZELLER et al. (1959) erklären dies durch die Hypothese, daß eine Stickstoffverbindung am Transportvorgang selbst beteiligt ist. Sie ziehen den Transport von Sulfat in Form seiner energiereichen Form, als PAPS, in Erwägung. Diese Möglichkeit kann jedoch nach dem heutigen Stand der Erkenntnisse ausgeschlossen werden (BORST-PAUWELS, 1981). Die angewandten Methoden lassen vielmehr den Schluß zu, daß die gemessene Stickstoffabhängigkeit eher auf die Notwendigkeit einer kontinuierlichen de novo-Synthese des Transportsystems zurückzuführen ist. Die Autoren messen die Sulfataufnahme in komplettem Medium über einen Zeitraum von 1 - 3 Stunden.

Für den eindeutigen Beweis einer Beziehung zwischen Sulfat-Transport, Glucose und Ammonium-Ionen sind weitere umfangreiche Experimente erforderlich. Da diese Fragestellung jedoch für das Thema dieser Arbeit nicht von wesentlicher Bedeutung war, wurden keine weiteren Untersuchungen in dieser Richtung durchgeführt.

Die Untersuchungen zum Einfluß des Substratanalogons Sulfit auf die Sulfataufnahme sollten die Frage klären, ob der Transport der beiden chemisch ähnlichen Verbindungen in die Zelle durch denselben Träger erfolgt.

Es wurde zunächst versucht, einen Transmembraneffekt oder eine Transinhibition der Sulfataufnahme durch Präinkubation mit Sulfit nachzuweisen (vgl. 3.1.2.2). Untersuchungen anderer Autoren an verschiedenen Mikroorganismen hatten gezeigt, daß die Sulfataufnahme durch Sulfat oder seine Analoga, die über den Sulfat-Träger transportiert werden, gehemmt wird (YAMAMOTO und SEGEL, 1966; CUPPOLETTI und SEGEL, 1974; PASSERA und FERRARI, 1975; BRETON und SURDIN-KERJAN, 1977).
In Versuchen mit dem Sulfitbildner (Stamm 27) und dem Normalstamm (2) führte schon eine 10-minütige Präinkubation mit Sulfit zu einer drastischen Reduktion der Sulfataufnahme (Abb. 7).
Dies Ergebnis läßt sich durch Transinhibition des Sulfat-Transports erklären. Jedoch gibt es weitere Interpretationsmöglichkeiten, die auf der Wirkung von Sulfit als Zellgift beruhen.
Unter anderem wird die intrazelluläre ATP-Konzentration durch Sulfit gesenkt (SCHIMZ und HOLZER, 1979; KÖCK und SCHLEE, 1981; BAUMGARTEN, 1981). Allerdings ist dieser Effekt bei den hier untersuchten Hefen erst oberhalb der gewählten Konzentration von 1 mM zu beobachten (BAUMGARTEN, 1981). Daher kann die in Abbildung 7 dargestellte Hemmung nicht auf dies Phänomen zurückgeführt werden.

Es ist nicht auszuschließen, daß das SO_2-Molekül für den gemessenen Effekt verantwortlich ist, da es, wie die eigenen Ergebnisse (Abb. 25 - 28) und diejenigen anderer Autoren (MACRIS und MARKAKIS, 1974; SCHIMZ, 1980) zeigen, schnell und unkontrolliert in die Zelle einzudringen vermag.
Das Bisulfit-Molekül HSO_3^- könnte - aufgrund seiner Fähigkeit mit Disulfidbrücken in Proteinen zu reagieren (SCHROETER, 1966; SHAPIRO, 1977) - als direkter Hemmstoff des Sulfat-Transportproteins wirken.
Auf den Einfluß von Sulfit auf Membrankomponenten und, dadurch bedingt, auf Transportsysteme, wurde bereits in der Einleitung hingewiesen (KAPLAN et al., 1974; KAPLAN et al., 1975; HAYATSU, 1976; SCHIMZ und HOLZER, 1979; SCHIMZ, 1980; RABE und KREEB, 1980; ANACLETO und VAN UDEN, 1982).
Weiterhin wäre denkbar, daß Sulfit nicht mit dem Sulfat-Transportsystem direkt reagiert, sondern indirekt über die den Transport energetisierende H^+ /ATPase. Für diese Interpretationsmöglichkeit sprechen Untersuchungen von McDONOUGH und Mitarbeitern (1980), die beobachteten, daß Sulfit die Plasmamembran-ATPase aus Stämmen von Saccharomyces cerevisiae deutlich hemmt. Der Einfluß ist pH-abhängig und bewirkt eine 85%ige (pH 5.5) bzw. 74%ige (pH 8.0) Verminderung der Aktivität. VASILJEVA et al. (1982) und ZAKHAROV et al. (1983) wiesen nach, daß Sulfit die H^+/ATPase aus Chloroplasten- und Mitochondrien-Proteoliposomen durch strukturelle Modifikation des Enzymkomplexes hemmt. Die Autoren führen dies auf Reaktionen mit Disulfidbrücken des Enzyms zurück.
Da Sulfit in Anwesenheit von Metallionen zu Sulfat oxidiert wird (Abb. 12; ROY und TRUDINGER, 1970; BRIMBLECOMBE und SPEDDING, 1974) ist auch ein anderer Effekt nicht auszuschließen: Trotz strikt anaerober Bedingungen wird vermutlich ein Teil des Sulfits oxidiert und der gemessene Effekt könnte zumindest teilweise auf Sulfat zurückzuführen sein. Allerdings beträgt die Halbwertszeit der Reaktion 300 $\pm$ 50 Minuten (BRIMBLECOMBE und SPEDDING, 1974). Daher kann der Oxidationseffekt zumindest für die ersten Meß-

punkte in Abb. 7 mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.
Es wurde schon darauf hingewiesen, daß der Sulfat-Transport einer Regulation durch intrazelluläre Schwefelverbindungen unterliegt. Daher muß auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß Sulfit in der Zelle weiter reduziert wird und daß Reduktionsprodukte die gemessene Hemmung bewirken.

Ob die Hemmung der Sulfataufnahme durch Präinkubation mit Sulfit auf eine Transinhibition oder auf andere Mechanismen zurückzuführen ist, läßt sich nicht sicher entscheiden. Die Hemmung der Sulfataufnahme auf der Ebene der Regulation ist ein vergleichsweise langsamer Vorgang. Im Falle einer Transinhibition durch Sulfat oder seine Analoga wird der maximale Hemmeffekt erst nach 1 - 2 Stunden erreicht (CUPPOLETTI und SEGEL, 1974; MARZLUF, 1975; BRETON und SURDIN-KERJAN, 1977). Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen tritt der Hemmeffekt jedoch nach kurzer Präinkubationszeit ein. Schon nach 10-minütiger Vorbehandlung (Abb. 7) kommt der Sulfat-Transport fast vollständig zum Erliegen. Das spricht dafür, daß eher die toxischen Eigenschaften des Sulfits für die gemessene Hemmung verantwortlich sind.

Alle Untersuchungen zum Einfluß von Sulfit auf die Sulfataufnahme machen deutlich, daß der Transport durch das Analogon stark gehemmt wird (Abb. 6 - 11).
Das Sulfat-Transportsystem des Normalstammes ist bei Konzentrationen < 1 mM empfindlicher gegenüber Sulfit als das des Sulfitbildners (Abb. 6).
Diese Beobachtung könnte möglicherweise für die Frage der Sulfitresistenz von Bedeutung sein. Die von BAUMGARTEN (1981) durchgeführten Untersuchungen haben eine geringfügig größere Resistenz der hier untersuchten sulfitbildenden Hefen gegenüber den Normalstämmen ergeben. Ein Grund hierfür könnte beispielsweise eine erhöhte Resistenz von Transportproteinen

der Sulfitbildner sein, wie es sich im Falle des Sulfat-Trägers nachweisen ließ (Abb. 6). Zu denken wäre dabei an eine strukturelle Modifikation, die eine geringere Angriffsfläche für das Sulfit-Molekül bietet. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen von PFLEIDERER und Mitarbeitern (1956) gestützt. Die Autoren weisen darauf hin, daß sich analoge Enzyme aus verschiedenen Mikroorganismen in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Sulfit unterscheiden. Sie vermuten, daß dies eine Ursache der höheren Sulfitresistenz der Hefen im Vergleich zu Bakterien sein könnte.

Da Sulfit in verschiedenen molekularen Formen existiert, stellt sich die Frage, welche Form für die Hemmwirkung verantwortlich ist und welcher Hemmtyp vorliegt. Je nach Sulfit-Species oder Hemmtyp ist eine Kompetition um denselben Träger oder eine toxische Wirkung des Sulfits wahrscheinlicher. Sollte sich beispielsweise das $SO_3^{=}$-Anion als die hemmende Species herausstellen, liegt die Vermutung einer Kompetition näher als im Falle des SO_2-Moleküls bzw. des HSO_3^--Anions. Auch die kinetische Analyse kann Aufschluß über den Wirkungsmechanismus des Sulfits geben. Eine kompetitive Hemmung macht einen gemeinsamen Träger für Sulfat und Sulfit wahrscheinlicher als ein anderer Hemmtyp.
Die Versuchsreihen machen deutlich, daß der zu messende Hemmeffekt auf das HSO_3^--Anion zurückzuführen ist (Abb. 8 und 9). Dies Ergebnis schließt allerdings mehrere Interpretationsmöglichkeiten ein.
Die Kompetition um denselben Träger ist nicht wahrscheinlich, da es sich beim Sulfat um ein zweiwertiges, beim Bisulfit um ein einwertiges Anion handelt. Allerdings sind Transportsysteme bekannt, die in Abhängigkeit vom pH-Wert verschiedenwertige Formen des Substrats translozieren können (BRAZY und DENNIS, 1981; KONINGS und BOOTH, 1981; LOWE und LAMBERT, 1983; LANGRIDGE-SMITH et al., 1983).
Die toxische Wirkung von Bisulfit als Inhibitor des Transportsystems selbst bzw. der energieliefernden Prozesse ist daher, wie schon im Zusammenhang mit der Transinhibition erläutert wurde, die wahrscheinlichere Ursache.

Aufgrund der gewählten Versuchsbedingungen, vor allem des pH-Wertes (4 bis 5.8, vgl. Tab. 4), liegt das eingewogene Sulfit zum größten Teil als Bisulfit-Anion vor. Die Konzentrationsdifferenzen betragen bis zu drei Zehnerpotenzen (0.01 mM SO_2 : 16.7 mM HSO_3^- : 0.2 mM $SO_3^=$ (vgl. Tab. 4, Spalte C)). Dennoch wäre auch denkbar, daß außer dem Bisulfit- auch das SO_2- und/oder das $SO_3^=$-Molekül die Sulfataufnahme beeinflussen. Die Wirkung der beiden letztgenannten Moleküle entzöge sich jedoch aufgrund der hohen Bisulfitkonzentration der Beobachtung. Im Hinblick auf das SO_2-Molekül sprechen jedoch die Ergebnisse aus Abb. 28 gegen diese Annahme. Der Effekt so geringer SO_2-Konzentrationen wie 0.01 mM ist meßbar, selbst bei um den Faktor 10^3 höheren Bisulfitkonzentrationen. Einflüsse des SO_2-Moleküls in ähnlich geringen Konzentrationen beschreiben auch andere Arbeitsgruppen (SCHIMZ, 1980; SPEDDING et al., 1980b).

Die kinetische Analyse der Sulfithemmung (Abb. 10 und 11) zeigt, daß es sich um eine nicht-kompetitive Hemmung handelt, d.h. Inhibitor (Sulfit) und Substrat (Sulfat) werden nicht an derselben Stelle des Trägermoleküls angelagert. Aufgrund dieser Analyse kann die Möglichkeit einer Kompetition um denselben Träger, d.h. das gleiche Transportsystem für Sulfat und das Bisulfit-Anion, ausgeschlossen werden. Es ist daher wahrscheinlich, daß sich die Wirkung des Bisulfits durch seine zelltoxischen Eigenschaften erklären läßt, z.B. durch Kompetition um die Energiequelle (H^+/ATPase) und/oder durch die Reaktion mit Disulfidgruppen außerhalb des katalytischen Zentrums.
Daß zusätzlich auch $SO_3^=$ mit Sulfat um dieselbe Bindungsstelle konkurriert, oder daß SO_2 aufgrund seiner zelltoxischen Eigenschaften die Sulfataufnahme beeinflußt, kann jedoch - wie erläutert wurde - aufgrund der großen Konzentrationsunterschiede nicht völlig ausgeschlossen werden. Allerdings sind diese Effekte nicht nachweisbar.

Der Einfluß von Sulfit auf die Sulfataufnahme wurde von verschiedenen Autoren untersucht. Dabei wird meist darauf hingewiesen, daß die Untersuchungen erschwert waren oder nicht eindeutig interpretierbar sind. Experimentelle Schwierigkeiten ergaben sich vor allem durch Einsatz von verunreinigten Ausgangssubstanzen (MAW, 1963a; YAMAMOTO und SEGEL, 1966; TWEDDIE und SEGEL, 1970) und durch Oxidation während der Inkubationsdauer (SEGEL und JOHNSON, 1961; POSTGATE, 1963; MAW, 1963a; YAMAMOTO und SEGEL, 1966; SPEDDING et al., 1980a).
Bei den meisten Untersuchungen beschränken sich die Autoren darauf, die Hemmung einer oder zweier Sulfitkonzentrationen zu ermitteln, ohne die Ursache weiter zu untersuchen.
Nur in einem Fall wird die Frage nach der hemmenden Species gestellt (YAMAMOTO und SEGEL, 1966). Die Autoren kommen zu dem Schluß, daß es sich dabei um das Metabisulfit-Molekül ($S_2O_5^=$) handelt.
In allen Fällen hemmt Sulfit die Sulfataufnahme stark. Dabei schwanken Hemmeffekt und eingesetzte Konzentration von Organismus zu Organismus. Bei Hefen hemmt 0.6 mM Sulfit die Aufnahme um 5.8 bzw. 38% (KLEINZELLER et al., 1959), bei Penicillium notatum und Salmonella typhimurium bewirkt 0.2 mM Sulfit eine 100%ige Hemmung (DREYFUSS, 1964; CUPPOLETTI und SEGEL, 1974). Andere Autoren weisen eine 37- bzw. 10-, 54- bzw. 65%ige Reduktion des Transports je nach pH-Wert und Konzentration nach (YAMAMOTO und SEGEL, 1966). Bei Neurospora beträgt die Aufnahme nach Zugabe von 5 mM Sulfit nur noch 27% (Myzel) bzw. 16% (Konidien). Eine genaue Analyse des Hemmtyps erfolgte nur in zwei Fällen. Sowohl KOTYK (1959) als auch KLEINZELLER et al. (1959) wiesen bei Hefen eine kompetitive Hemmung der Sulfataufnahme durch Sulfit nach, erwähnen aber gleichzeitig Probleme bei der Interpretation der Versuchsergebnisse: "... an exact mathematical expression, however, was impossible on account of the complexity of the system and with sulphite also because of its gradual oxidation in the suspension" (KOTYK, 1959, Inkubationsdauer 60 Minuten!) bzw. "The Lineweaver-Burk-plot of sulphite and thiosulphate inhibition

with sulphur-deficient yeast indicates that thiosulphate acts as a competitive inhibitor of sulphate uptake; sulphite, however, behaves somewhat anomalously at concentrations greater than 1 mM" (KLEINZELLER et al., 1959).
Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen machen deutlich, daß die Hemmung der Sulfataufnahme durch Sulfit eher durch die zelltoxische Wirkung als durch eine Kompetition um denselben Träger bedingt ist. Die Hemmung tritt in diesen Fällen auch dann auf, wenn nachgewiesen werden konnte, daß die beiden Anionen nicht von demselben Träger durch die Membran transportiert werden (TWEEDIE und SEGEL, 1966; MARZLUF, 1974; BROWN und SHRIFT, 1980). TWEEDIE und SEGEL (1966) stellten beispielsweise fest, daß Sulfat nicht die Sulfitaufnahme, Sulfit jedoch die Sulfataufnahme hemmt. Dies Ergebnis legt den Schluß nahe, daß die Wirkung des Sulfit-Moleküls nicht in einer Kompetition liegen kann. Auch BRADFIELD et al. (1970) und MARZLUF (1974) kommen aufgrund ihrer experimentellen Daten zu dem Schluß, daß der Effekt von Sulfit auf toxische Reaktionen, z.B. durch Reduktion essentieller Disulfidbrücken, zurückzuführen sein könnte.

Die eigenen Ergebnisse bestätigen diese Interpretation der Sulfit-bedingten Hemmung des Sulfat-Transportsystems. Sie zeigen, daß Sulfit die Sulfataufnahme unspezifisch, d.h. aufgrund seiner toxischen Wirkung, hemmt. Der meßbare Effekt ist auf das Bisulfit-Molekül zurückzuführen. Auch der ermittelte Hemmtyp (nicht-kompetitiv, Abb. 10 und 11) stützt diese Interpretation. Es gibt keine experimentellen Hinweise auf einen Transport von Sulfat und Sulfit über denselben Träger. Allerdings läßt sich diese Möglichkeit nicht völlig ausschließen.

4.2 Sulfit-Efflux

Intrazelluläre Verbindungen müssen, um vom Zellinneren ins umgebende Medium zu gelangen, die hydrophobe Barriere "Zellmembran" passieren. Wie bei der Stoffaufnahme sind dazu verschiedene

Transportmechanismen verwirklicht. Zur Charakterisierung des Efflux sind im Vergleich zum Influx wenige Untersuchungen durchgeführt worden. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß die gleichen Prinzipien gelten. Auch am Transport aus der Zelle sind sowohl einfache Diffusion als auch trägervermittelter Transport beteiligt (MALONEY und WILSON, 1973; BOOTH und HAMILTON, 1980). Wie schon erwähnt wurde, sind für Influx und Efflux entweder dieselben oder auch unterschiedliche Träger verantwortlich. Im Hinblick auf die Energieabhängigkeit der Efflux-Prozesse sind verschiedene Mechanismen verwirklicht (HOFFEE et al., 1964; DE WAARD und NISTELROOY, 1980; NISHIMUNET et al., 1981; HORÁK und ŘÍHOVÁ, 1982).

Untersuchungen zum Efflux werden dadurch erschwert, daß die intrazellulären Bedingungen, wie beispielsweise Substratkonzentration und pH-Wert, kaum beeinflußt werden können. Wenn möglich, verwendet man zur Charakterisierung des Efflux nicht metabolisierbare Substrate, mit denen die Zellen zunächst beladen werden. Handelt es sich jedoch, wie im hier vorliegenden Fall, um ein Stoffwechselprodukt, werden die Untersuchungen zusätzlich erschwert. Die Ergebnisse sind oft nicht eindeutig zu interpretieren, da Änderungen der Transportrate nicht nur auf den Transportvorgang selbst, sondern auch auf Stoffwechselvorgänge zurückgeführt werden können. Gängige Untersuchungsmethoden, die wichtige Aufschlüsse über einen Transportvorgang liefern könnten, scheiden aufgrund der gegebenen Verhältnisse von vornherein aus. Die Temperaturabhängigkeit eines Transportvorgangs beispielsweise zur Ermittlung der Aktivierungsenergie läßt Schlüsse darüber zu, ob es sich um einen katalysierten Prozeß oder um einfache Diffusion handelt. Sind jedoch enzymkatalysierte Reaktionen dem Transport vorgeschaltet, wie im hier vorliegenden Fall, so ist diese Unterscheidung nicht möglich, da der ermittelte Wert mit Sicherheit auch durch den Stoffwechsel beeinflußt ist. Ein diskontinuierliches Arrhenius-Diagramm, das - untersucht man ausschließlich Transportprozesse - auf Phasenänderungen in der

Membran zurückzuführen ist, ließe sich im hier vorliegenden Fall auch nicht eindeutig interpretieren. Proteine weisen nicht immer eine kontinuierliche Arrhenius-Gerade auf (CANTOR und SCHIMMEL, 1980). Außerdem kann ein Bruch im Diagramm auch durch den Wechsel der Schrittmacherreaktion bedingt sein (HÖFER, 1977). Dies muß im hier untersuchten Fall des Sulfit-Efflux, bei dem mehrere Reaktionen - Stoffwechsel und Transport - aneinander gekoppelt sind, ebenfalls in Erwägung gezogen werden.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen kommt noch hinzu, daß das transportierte Substrat toxisch ist, chemisch leicht verändert wird und außerdem in drei verschiedenen molekularen Formen in wässriger Lösung vorliegt. Dadurch wird eine eindeutige Interpretation experimenteller Daten oft unmöglich gemacht.

Zu Beginn der Untersuchungen wurde versucht, das Problem des Metabolismus zu umgehen. Es war jedoch nicht möglich, die Zellen mit Sulfit zu beladen.

Es stellte sich heraus (Tab. 7 und 14; Abb. 35 und 36), daß die intrazelluläre Sulfitkonzentration nach Wachstum mit Sulfat extrem gering ist und der 24-stündige Sulfit-Efflux (Abb. 13) auf intrazellulär gespeichertes Sulfat zurückzuführen ist. Daher muß bei der Auswertung sämtlicher Transport-Experimente der Einfluß des Energie- und Schwefel-Stoffwechsels mit berücksichtigt werden.

Um zu klären, wie, d.h. über welchen Träger und in welcher Form Sulfit aus der Zelle ausgeschieden wird, sollte zunächst festgestellt werden, ob sich die Hefen eines Sulfit-spezifischen oder eines anderen Transportsystems bedienen. Daher wurde der Einfluß verschiedener Anionen auf den Sulfit-Efflux untersucht.

Ziel dieser Versuchsreihe (vgl. 3.2.3) war es, einen möglichen Transmembraneffekt nachzuweisen. Tab. 5 und die Abbildungen 15 und 16 zeigen, daß, mit Ausnahme von $CrO_4^{=}$, $SeO_4^{=}$ und $SeO_3^{=}$, keines der getesteten Anionen den Sulfit-Transport beeinflußt.
Von vornherein war klar, daß diese Versuchsreihe nur im Falle eines positiven Ergebnisses, also beim Nachweis eines Transmembraneffekts, eine klare Deutung zuließe. Das tatsächlich erzielte Versuchsergebnis dagegen läßt verschiedene Interpretationen zu. Es kann nicht entschieden werden, ob der Sulfit-Efflux tatsächlich unabhängig vom Transport der getesteten Substrate erfolgt oder ob aufgrund einer zu geringen intrazellulären Substrat-, d.h. Sulfitkonzentration, die theoretisch möglichen Effekte nicht meßbar sind. Die in einem späteren Versuch ermittelte geringe intrazelluläre Sulfitkonzentration von 0.6 mM (Tab. 7 und 14) stützt die zweite Überlegung.
Die Analoga $CrO_4^{=}$, $SeO_4^{=}$ und $SeO_3^{=}$ hatten einen hemmenden Einfluß auf den Efflux (Tab. 5; Abb. 15 und 16). Es ist bekannt, daß diese Verbindungen energieliefernde Prozesse des Hefestoffwechsels und Enzyme der Sulfat-Assimilation hemmen (VALLEE und JEANJEAN, 1968b; TWEEDIE und SEGEL, 1970; ROBERTS und MARZLUF, 1971; LUKASZKIEWICZ und PIENIĄŻEK, 1972; CUPPOLETTI und SEGEL, 1974; BRETON und SURDIN-KERJAN, 1977). Berücksichtigt man, daß der Stoffwechsel und nicht der Transport den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Sulfit-Ausscheidung darstellt (Abb. 24), wird die gemessene Reduktion des Efflux verständlich. Der Einfluß von $CrO_4^{=}$, $SeO_4^{=}$ und $SeO_3^{=}$ auf den Transportvorgang selbst muß ebenfalls als Erklärung für die gemessene Hemmung des Sulfit-Efflux in Erwägung gezogen werden.

Wird der Transport zweier Substrate vom gleichen Träger vermittelt, ist zu erwarten, daß Substanzen, die den Transport des einen Substrats hemmen, den des anderen in der gleichen Weise beeinflussen. Diese Überlegung läßt sich auf die hier zu klärende Frage eines Sulfit-Efflux über den Sulfat-Träger übertragen. Das Sulfat-Transportsystem der Weinhefen wird durch die schwefel-

haltigen Aminosäuren Methionin und Cystein gehemmt (ESCHENBRUCH, 1972a und b; ESCHENBRUCH, 1974; MINÁRIK und NAVARA, 1973; 1974). DOTT et al. (1977) konnten zeigen, daß dies auf eine Repression des Trägers zurückzuführen ist. Folglich ist - im Falle eines Sulfit-Efflux über den Sulfat-Träger - nach Zugabe der beiden Aminosäuren eine Hemmung des Efflux zu fordern.

Nur im Falle einer Hemmung des Sulfit-Efflux durch Methionin und Cystein wäre eine eindeutige Interpretation des Versuchsergebnisses möglich. Dies hätte als deutlicher Hinweis auf einen gemeinsamen Träger gewertet werden können.
Stattdessen wurde jedoch keine Hemmung, sondern sogar eine Steigerung des Efflux verzeichnet (Abb. 17). Dies Ergebnis erlaubt den Schluß, daß der Sulfit-Efflux unabhängig vom Sulfat-Träger erfolgt, da trotz Repression des Sulfat-Transportsystems ein ungehinderter Efflux erfolgt.
Diese scheinbare Eindeutigkeit des Versuchsergebnisses muß allerdings eingeschränkt werden. Die fehlende Verringerung des Sulfit-Efflux nach Zugabe der Aminosäuren könnte darauf zurückzuführen sein, daß das Sulfat-Transportsystem auch unter reprimierten Bedingungen noch in der Lage ist, die geringe intrazelluläre Sulfitmenge (vgl. spätere Ergebnisse, Tab. 7) aus der Zelle zu transportieren. Für diese Möglichkeit spricht die Beobachtung, daß das Sulfat-Transportsystem der Hefen nicht vollständig durch Methionin und Cystein reprimiert werden kann. In Abhängigkeit vom Hefestamm und der eingesetzten Konzentration wird die Sulfat-Aufnahme bis zu 90% gehemmt (ESCHENBRUCH, 1972a und b; ESCHENBRUCH, 1974; MINÁRIK und NIVARA, 1973; 1974). Bei dem hier untersuchten Hefestamm erfolgt eine Reduktion der Sulfataufnahme nach 70-minütiger Präinkubation mit 0.5 mM Methionin um 75% (DOTT et al., 1977). Auch bei längerer Inkubation mit Methionin, z.B. bei Anzucht der Zellen in einem Medium, das sowohl Sulfat (7.5 mM) als auch Methionin (1 mM) enthält, findet eine Sulfataufnahme statt, wenn auch in geringerem Umfang (33%) als bei alleiniger Anwesenheit von Sulfat (DOTT, 1977, HEINZEL, 1978).

Der Sulfit-Efflux der Methionin- und der Cystein-Kultur ist gegenüber der Kontrolle erhöht (Abb. 17). Dies Ergebnis könnte auf ein Transportphänomen zurückzuführen sein und setzt voraus, daß der Sulfit-Efflux nicht über das Sulfat-Transport-System erfolgt, daß aber ein Teil des ausgeschiedenen Sulfits über einen durch Methionin und Cystein reprimierbaren Träger, z.B. das Sulfat-Transportsystem, wieder aufgenommen wird. Durch die Repression dieses Systems wird eine erneute Aufnahme des Sulfits verhindert und der Efflux erhöht.
Die gesteigerte Sulfitbildung ließe sich jedoch auch auf der Ebene der Regulation der beteiligten Enzyme erklären. Die der Sulfitbildung vorausgehenden Enzyme (vgl. Abb. 2) ATP-Sulfurylase und PAPS-Sulfotransferase werden - mit Ausnahme der PAPS-Sulfotransferase bei Zugabe von Cystein - durch Methionin und Cystein nicht reprimiert (HEINZEL, 1978; BAUMGARTEN, 1981). Da jedoch das folgende Enzym, die Sulfitreduktase, einer Repression durch die beiden Aminosäuren unterliegt (DOTT, 1977), könnte dies zu einem gesteigerten Sulfit-Efflux gegenüber der Kontrolle führen. Das gesamte intrazelluläre Sulfat wird unter diesen Bedingungen als Sulfit ausgeschieden und Methionin bzw. Cystein zur Synthese der Zellbausteine verwendet. Dieser Weg erweist sich als energetisch günstiger für die Zellen, was sich in einem höheren Zellertrag ausdrückt (vgl. 3.2.3; MAW, 1963a; MAW, 1965).

Ein wichtiges Kriterium für die Charakterisierung von Transportprozessen ist die Energieabhängigkeit. Daher wurde der Einfluß der Entkoppler DNP, TSA und CCCP, der Hemmstoffe der Plasmamembran-ATPase DCCD und DES und des Glykolyse-Inhibitors IAA auf den Sulfit-Efflux untersucht.
Die primäre Wirkung von Entkopplern ist auf ihre Eigenschaft als Protonophore zurückzuführen, d.h., daß sie die Permeabilität der Membranen für Protonen erhöhen (STARK, 1978; McLAUGHLIN und DILGER, 1980). Darüber hinaus sind jedoch auch andere Wirkungsmechanismen nachgewiesen (VAN DEN BROEK et al., 1982;

VAN DEN BROEK und STEVENICK, 1983). Aufgrund ihrer Wirkung als Protonophore verursachen Entkoppler einen Ausgleich der intra- und extrazellulären Protonenkonzentration. Bei einem niedrigen extrazellulären pH-Wert kann dies zu einer Erniedrigung der intrazellulären Wasserstoffionenkonzentration führen (KOMOR et al., 1979), die wiederum eine Störung des Zellstoffwechsels bedingt.
Daher wäre es denkbar, daß der Einsatz von Entkopplern oder ähnlich wirkenden Substanzen, wie z.B. Nystatin, zu einer Verringerung des Sulfit-Efflux führt, die jedoch nicht auf eine Hemmung des Transportschrittes, sondern des Stoffwechsels durch die Erniedrigung des Zell-pH-Wertes zurückzuführen ist.
Hierfür sprechen die Untersuchungsergebnisse zum Einfluß von DNP und Nystatin auf den Sulfit-Efflux (Abb. 18, 19 und 21). Man erkennt, daß der Sulfit-Efflux bei pH 5 gehemmt wird (Abb. 18 und 19), bei pH 6.5 ist dagegen kein Unterschied zur Kontrolle zu beobachten (Abb. 21). Dies könnte bedeuten, daß DNP nur bei hoher Protonenkonzentration seinen entkoppelnden Einfluß entfalten kann. Zwar ist die Wirkung von DNP tatsächlich pH-abhängig, da das Molekül in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedlich stark dissoziiert vorliegt; der entkoppelnde Effekt ist bei pH 5 stärker als bei pH 6.5 (VAN DEN BROEK et al., 1982; STARK, 1978). Allerdings zeigen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, daß DNP auch bei pH 7.5 noch als Entkoppler wirkt (HAUER und HÖFER, 1978). Außerdem garantieren die hier eingesetzten hohen Konzentrationen bis zu 5 mM (Abb. 18 und 21) ausreichende Mengen undissoziierten DNPs. Bei pH 5.0 werden energieabhängige Prozesse bei Hefen schon durch 0.1 - 1.0 mM deutlich gehemmt (KOTYK und HÖFER, 1965; BECKER und NAIDER, 1977; OKOROKOV et al., 1977; MISRA und HÖFER, 1978; COOPER et al., 1979; ROOMANS et al., 1979; HOSAKA und YAMASHITA, 1980; HORÁK und ŘÍHOVÁ, 1982).
Obwohl also DNP bei pH 6.5 als Entkoppler wirksam ist, wird der Sulfit-Efflux nicht vermindert (Abb. 21). Die starke Hemmung bei pH 5 (Abb. 18) ist im Gegensatz dazu mit großer Wahrscheinlichkeit durch Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes und Störung

des Zellstoffwechsels bedingt. Zu einem ähnlichen Schluß führen die Untersuchungen zum Einfluß von Nystatin bei pH 5 (Abb. 19). Da hier im optimalen pH-Bereich der Nystatin-Wirkung gearbeitet wird (BEGEMANN, 1983), ist die gemessene Hemmung des Sulfit-Efflux durch Nystatin vermutlich auch auf die Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes zurückzuführen (HAMMOND et al., 1974; PALACIOS und SERRANO, 1978; BEEZER et al., 1982; EILAM, 1982b).

Die vorhergehenden Versuche und Überlegungen machen deutlich, daß es sowohl nötig als auch zulässig ist, die Untersuchungen mit Entkopplern bei einem pH-Wert durchzuführen, der dem intrazellulären Wert entspricht (KOTYK, 1963; RYAN und RYAN, 1972; BORST-PAUWELS, 1981; SLAVÍK, 1981, KOTYK et al., 1982b).

Die Ergebnisse (Abb. 20 - 22; Tab. 6) machen deutlich, daß der Sulfit-Efflux mit großer Wahrscheinlichkeit nicht an energieliefernde Prozesse in der Zelle gekoppelt ist.
Von den 5 untersuchten Transportinhibitoren hemmt allein TSA (Abb. 22) den Sulfit-Efflux. Dies könnte auf eine direkte Wechselwirkung mit dem Träger zurückzuführen sein (VAN DEN BROEK et al., 1982; VAN DEN BROEK und STEVENICK, 1983). Die vier anderen klassischen Hemmstoffe von Transportprozessen, CCCP, DNP, DCCD und DES, bewirken keine Verringerung des Efflux. Erst extrem hohe CCCP-Konzentrationen, das 50-fache der Konzentration, die in der Regel Transportvorgänge der Hefen hemmt (SERRANO, 1977; HAUER und HÖFER, 1978; HOSAKA und YAMASHITA, 1980; KOVÁČ und VAREČKA, 1981; VACATA et al., 1981), führt zu einer Verringerung der ausgeschiedenen Sulfitmenge (Tab. 6). Ein sekundär aktiver Transport, d.h. eine Kopplung des Efflux an den Protonengradienten der Membran, kann daher ausgeschlossen werden; denn weder Entkoppler (Protonophore, die einen Ausgleich des Protonengradienten bewirken) noch Hemmstoffe der Plasmamembran-ATPase (es kann kein Protonengradient erzeugt werden) hemmen den Efflux.

Die Zugabe von IAA, einem Inhibitor der Glykolyse, führt dagegen zu einer deutlichen Verringerung des Sulfit-Efflux (Abb. 23). Dies Ergebnis läßt zwei Interpretationsmöglichkeiten zu:

(1) eine direkte Beteiligung von ATP am Transportvorgang, das bedeutet einen primär aktiven Transport von Sulfit, also eine Sulfit-transportierende ATPase

(2) eine Verringerung des Sulfit-Efflux durch Hemmung des vorgeschalteten Stoffwechsels.

Spätere Versuchsergebnisse (vgl. 3.2.9) sprechen für die zweite Hypothese. Es konnte gezeigt werden, daß das ausgeschiedene Sulfit in der Zelle fast ausschließlich als Sulfat gespeichert vorliegt (Abb. 35 und 36; Tab. 13 und 14). Daher ist der Effekt des IAA mit großer Wahrscheinlichkeit eher in der Wirkung auf die energieabhängigen Schritte der Sulfatreduktion zu sehen, als im Einfluß auf eine hypothetische Sulfit-transportierende ATPase. Schon YAMAMOTO und SEGEL (1966) konnten zeigen, daß IAA den Schwefelmetabolismus hemmt. Außerdem sind bei Hefen nur sehr wenige Fälle (Protonen und möglicherweise bestimmte Kationen) bekannt, in denen ein Transportvorgang direkt durch die Spaltung von ATP oder Polyphosphat energetisiert wird (KOTYK, 1980).

Mit Ausnahme des DNP, das den Sulfit-Efflux gar nicht beeinflußt, und TSA, das ihn hemmt, führen die eingesetzten Inhibitoren zu einem verstärkten Ausfluß von Radioaktivität (Abb. 20, 21 und 22) bzw. Sulfit (Tab. 6). Während CCCP und DES nur eine geringe Stimulation des Efflux bewirken, wird bei Zugabe von DCCD etwa 50% mehr Radioaktivität im Überstand nachgewiesen. Für dieses Phänomen sind zwei Erklärungen möglich. Die eine Interpretation setzt mindestens zwei Transportsysteme für Sulfit voraus. Neben demjenigen, das den Efflux vermittelt, müßte noch ein weiteres existieren, das Sulfit aktiv aufnehmen kann. Zu denken ist z.B. an den Sulfatträger oder ein anderes Anionen-Transportsystem. Die Hemmung dieses Trägers durch CCCP, DES und DCCD (DELHEZ et al., 1977; DUFOUR et al., 1980) verhindert eine Wiederaufnahme des ausgeschiedenen Sulfits und führt zu einer höheren extrazellulären

Sulfitkonzentration. Diese Möglichkeit wäre durch Untersuchungen der Sulfitaufnahme zu klären. Der verstärkte Ausfluß von Radioaktivität läßt sich auch anders deuten. Es könnte sich dabei um radioaktives Sulfat handeln. Wie spätere Versuche zeigen, speichern die Sulfit bildenden Hefen hohe Sulfatkonzentrationen (Tab. 14). Dies Sulfat verbleibt, wie Kontrollversuche zeigen (Abb. 17, es wird nur Sulfit, jedoch kein Sulfat ausgeschieden), gegen seinen Konzentrationsgradienten in der Zelle. Es wäre möglich, daß bei Zugabe von Substanzen, die aktive Transportvorgänge der Hefen beeinflussen, wie CCCP, DES und DCCD, verstärkt Sulfat aus den Zellen fließt (WEDDING und BLACK, 1960; YAMAMOTO und SEGEL, 1966). Die Untersuchungen an Stamm 27 (Tab. 6) sprechen eher gegen diese Möglichkeit. Zumindest im Fall des CCCP konnte durch chemische Sulfitbestimmung (nach PAUL, 1958) im Überstand gezeigt werden, daß Sulfit und nicht Sulfat aus der Zelle ausgeschieden wird.

Bei den Untersuchungen zum Einfluß von extrazellulärem Sulfit auf den Sulfit-Efflux stellte sich heraus, daß eine lineare Beziehung zwischen Hemmung des Efflux und extrazellulärer Sulfit-Konzentration besteht.
Es konnte eindeutig bewiesen werden, daß die gemessene Hemmung auf das SO_2-Molekül zurückzuführen ist. Dies zeigt sich durch die pH-Abhängigkeit des Hemmeffekts (Abb. 27). Er vergrößert sich mit steigender Wasserstoffionen-Konzentration und läßt sich nur mit der steigenden SO_2-Menge in Einklang bringen. Auch der ungehinderte Efflux bei pH 5.8 zeigt, daß SO_2 für die beobachtete Hemmung verantwortlich ist. Außerdem wurde eine konstante Hemmung bei konstanter SO_2-Konzentration nachgewiesen (Abb. 28), obwohl sich die Menge des eingewogenen Gesamtsulfits um den Faktor 10 erhöhte (Tab. 4, Spalte C).
Es wurde schon darauf hingewiesen, daß SO_2 sehr schnell in Hefezellen eindringen und dann seine zelltoxische Wirkung entfalten kann (vgl. 4.1). Da der Sulfit-Efflux vom vorgeschalteten

Stoffwechsel bestimmt wird, ist die gemessene Hemmung vermutlich durch die zelltoxischen Eigenschaften des SO_2-Moleküls bedingt. Zu denken wäre beispielsweise an eine durch den intrazellulären pH-Wert bedingte Umlagerung zu HSO_3^-, welches dann die verschiedensten Prozesse beeinflußt, wie z.B. die Hemmung des Energie- und/oder Schwefelstoffwechsels durch Senkung des ATP-Gehaltes der Zellen (SCHIMZ und HOLZER, 1979; BAUMGARTEN, 1981) oder durch Reaktion mit Disulfidgruppen der beteiligten Enzyme. Auch die direkte Hemmung des Transportvorgangs durch Inaktivierung des Trägers selbst oder die Störung der Integrität der Membran (RABE und KREEB, 1980; KAPLAN et al., 1974; 1975) kann nicht ausgeschlossen werden.

Durch die folgenden Versuchsreihen sollte festgestellt werden, ob SO_2-Diffusion oder ein katalysierter Transport als Anion für den Sulfit-Efflux verantwortlich ist. Zur Klärung dieser Frage wurden zwei verschiedene Wege beschritten:

(1) Vergleich der intra- und extrazellulären Sulfitkonzentration
(2) Nachweis einer Ladungskompensation.

Falls eine eindeutige Beziehung zwischen Sulfit-Efflux und demjenigen bestimmter Kationen hergestellt werden könnte, wäre zum einen eine einfache Gasdiffusion als Transportweg auszuschließen und zum anderen aufgrund der Stöchiometrie eine Aussage darüber möglich, welches der beiden Anionen (HSO_3^- oder $SO_3^=$) die Membran durchquert.

Bislang gibt es noch keine Untersuchungen zur Bestimmung des intrazellulären Sulfits. Daher ist man im Hinblick auf diesen Punkt des assimilatorischen Schwefelstoffwechsels auf Hypothesen angewiesen (TORRI und BANDURSKI, 1967; SCHIFF und HODSON, 1973; SCHMIDT et al., 1974; TSANG und SCHIFF; 1976; WILSON und BIERER, 1976; BAUMGARTEN, 1981).

Zur Bestimmung der intra- und extrazellulären Sulfitkonzentration mußten sowohl geeignete Versuchsbedingungen ermittelt als auch spezielle Methoden entwickelt werden. Als geeignet erwies sich die Anzucht mit Glycerin, die anschließende Zentrifugation in eine 30%ige Glycerinlösung und die Permeabilisierung mit Nystatin (vgl. 3.2.7). Eine Behandlung mit Nystatin ermöglichte einen schonenden Zellaufschluß unter anaeroben Bedingungen. Durch Untersuchungen an Saccharomyces cerevisiae - Stämmen konnte gezeigt werden, daß die Inkubation mit Nystatin zu einem Ausfluß von Kalium-, Ammonium-Ionen und Aminosäuren führt (KOTYK et al., 1971; HAMILTON-MILLER, 1973; BEEZER et al., 1982; EILAM, 1982b). Auch für Moleküle wie NADH und ANTIMYCIN werden Hefezellen durchlässig (VON HEDENSTRÖM und HÖFER, 1979). Eine längere Inkubation hat schließlich eine vollständige Zerstörung der Membran zur Folge (CIRILLO et al., 1964).
Im vorliegenden Fall wurde eine ausreichende Permeabilisierung für Anionen anhand der Phosphat-Freisetzung aus den Zellen nachgewiesen (Abb. 32).

Die Bestimmung der intrazellulären Sulfitkonzentration ergab einen Wert von 0.6 mM (Tab. 7). Dies Ergebnis konnte auch bei Anwendung einer anderen Methode (Einsatz von $^{35}SO_4^{=}$) bestätigt werden (Tab. 14).
Es stellt sich die Frage, ob der gemessene Wert von 0.6 mM der tatsächlichen intrazellulären Konzentration entspricht oder ob die Zellen während der 2,5-stündigen Nystatin-Behandlung noch weiterhin intrazelluläres Sulfat zu Sulfit umgesetzt haben. Das läßt sich aufgrund der Ergebnisse nicht klar entscheiden. Unter Berücksichtigung dieser Möglichkeit liegt der ermittelte Wert von 0.6 mM eher zu hoch als zu niedrig. Das bedeutet für die ursprüngliche Fragestellung, daß sich das Verhältnis von intrazellulärem zu extrazellulärem Sulfit eher zu Ungunsten des intrazellulären Wertes verschiebt.

Der Vergleich der intra- und extrazellulären Sulfitkonzentration (Tab. 7) macht deutlich, daß einfache SO_2-Diffusion als Mechanismus für den Sulfit-Efflux mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Zum einen zeigt die Verteilung der molekularen Formen innerhalb und außerhalb der Zelle, daß eine SO_2-Diffusion aufgrund der höheren extrazellulären SO_2-Konzentration unmöglich ist. Auch die theoretische Überlegung, daß im Falle einer SO_2-Diffusion innerhalb der Zelle eine 100-fach höhere Gesamtsulfitkonzentration gefordert werden muß (vgl. 3.2.7), kann durch die experimentellen Daten nicht belegt werden (Tab. 7); denn der tatsächlich gemessene Faktor beträgt nur 3.

Es muß auch die Möglichkeit des Sulfit-Transports in gebundener Form, d.h. als Sulfonat, in Erwägung gezogen werden; der überwiegende Teil des extra- und intrazellulären Sulfits liegt in dieser Form vor (Abb. 29, 30 und 31; Tab. 7).
Eine Beteiligung der Sulfonate am Sulfit-Efflux kann jedoch aufgrund der intra- und extrazellulären Konzentrationsverhältnisse ausgeschlossen werden (vgl. Tab. 7 und 3.2.7.4).

Die bisherigen Ergebnisse schließen also eine SO_2-Diffusion und einen Transport von "gebundenem" Sulfit aus. Daher ist ein katalysierter Efflux von Sulfit als Anion wahrscheinlich. Die Konzentrationsverhältnisse (Tab. 7) lassen sowohl den Transport des HSO_3^-- als auch des $SO_3^{=}$-Moleküls zu.
Die Translokation von geladenen Molekülen über die Cytoplasmamembran erfordert eine Ladungskompensation, um eine Depolarisierung der Membran zu verhindern (NOBEL, 1974). Daher kann ein Anion eine Membran nur im Austausch für ein anderes Anion oder zusammen mit einem Kation durchqueren.
Für den Ladungsausgleich sind bei Hefen verschiedene Mechanismen verwirklicht. Die Erhaltung der Elektroneutralität wird durch Kalium-Ionen und Protonen (COCKBURN et al., 1975; SERRANO, 1977; ROOMANS et al., 1979; HÖFER et al., 1980; KOTYK und SIGLER, 1981; NIEMITZ et al., 1981) sowie organische und anorganische Anionen

(RIEMERSMA und ALSBACH, 1974; ROTHSTEIN, 1974; SERRANO, 1977; HÖFER et al., 1980; HAUER et al., 1981; KOTYK und SIGLER, 1981; EDDY, 1982) gewährleistet.

Die folgenden Untersuchungen sollten dazu dienen, einen Ladungsausgleich während des Sulfit-Efflux nachzuweisen.
Es ließ sich weder eine Beziehung zwischen Sulfit-Efflux und Protonen- bzw. Natrium-Konzentration noch eine Erhaltung der Elektroneutralität durch Anionen nachweisen (Abb. 33 und 34; Tab. 8, 9 und 11).
Die sulfitbildenden Zellen weisen jedoch einen höheren Kalium-Efflux auf als die Zellen ohne Sulfitproduktion (Tab. 9, 10 und 11). Der erhöhte Kalium-Efflux entspricht der Menge des ausgeschiedenen Sulfits.
Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Ladungskompensation des Sulfit-Efflux durch Kalium sehr wahrscheinlich.
Die Beziehung zwischen Sulfit-Transport bedingtem Kalium-Efflux und Sulfit-Efflux ist durch das Verhältnis 1 µmol K^+ : 1 µmol Sulfit gekennzeichnet. Diese Stöchiometrie macht deutlich, daß das einwertige Anion (HSO_3^-) diejenige molekulare Form des Sulfits darstellt, die transportiert wird.

Es stellt sich die Frage nach dem Mechanismus des nachgewiesenen Kalium-Sulfit-Transports. Ein elektroneutraler Kalium/Sulfit-Symport (GUNN, 1980) konnte experimentell ausgeschlossen werden (Tab. 12).
Es handelt sich daher um einen elektrogenen Sulfit-Efflux in der Richtung des elektrochemischen Protonen-Gradienten der Cytoplasmamembran (MISRA und HÖFER, 1975; McLAUGHLIN und DILGER, 1980; VACATA et al., 1981; KOVÁČ und VAREČKA, 1981; ULASZEWSKI et al., 1983). Der Ladungsausgleich dieses Transportschrittes erfolgt über einen unabhängigen Kalium-Träger (RYAN und RYAN, 1972; ROTHSTEIN, 1974; ROOMANS et al., 1977; NIEMITZ et al., 1981; EDDY, 1982; EILAM, 1982a).

Die Analyse der intrazellulären Schwefelverbindungen der hier untersuchten Hefen galt zunächst der Frage, in welcher Form der intrazelluläre Schwefel vorliegt, der einen 24-stündigen Sulfit-Efflux ohne externe Schwefelquelle ermöglicht. Gleichzeitig erfolgte ein Vergleich zwischen Normalstamm und Sulfitbildner, da mögliche Unterschiede weitere Aufschlüsse über die Ursachen der Sulfitbildung geben könnten.

Hefen unterscheiden sich in ihrem Gehalt an intrazellulären Schwefelverbindungen. Diese Unterschiede sind stammspezifisch (LINDAN und WORK, 1951; MAW, 1965), werden jedoch aber auch von der Art der Schwefelquelle (CHEREST et al., 1973) und anderen Wachstumsbedingungen beeinflußt (LINDAN und WORK, 1951). Die Untersuchungen befassen sich in der Regel mit dem Gesamtschwefelgehalt (LINDAN und WORK, 1951;SUOMALAINEN und KERÄNEN, 1955; MAW, 1965; MAUGENET et al., 1972; DOTT, 1977) oder mit den schwefelhaltigen Aminosäuren und ihren Derivaten (SCHLENK und de PALMA, 1957; MAW, 1965; SCHLENK et al., 1970; CHEREST et al., 1973; WARNER et al., 1976).
HARTNELL und SPEDDING (1979) analysierten die intrazellulären Schwefelverbindungen bei Weinhefen im Hinblick auf das Phänomen der Sulfitbildung. Der Normalstamm und der Sulfitbildner unterschieden sich sowohl im Gehalt an "gebundenem" Sulfit als auch an Methionin und SAM. Die Ergebnisse zeigten, daß "gebundenes" Sulfit vor allem für den sulfitbildenden Stamm charakteristisch ist. Die Verteilung der intrazellulären Stoffwechselprodukte läßt auf eine verminderte Synthese von Methionin und seinen Metaboliten bei dem Sulfitbildner schließen.
Eine Bestimmung der intrazellulären Sulfat-Konzentration wurde nicht vorgenommen.

Eigene Untersuchungen (Abb. 35, 36; Tab. 13 und 14) ergaben, daß die in dem Sulfit bildenden Stamm nachgewiesene Sulfatkonzentration (26.8 mM) ausreicht, um den 24-stündigen Sulfit-Efflux zu bewirken.

Dagegen konnte in den Zellen des Normalstammes kein Sulfat nachgewiesen werden. Der Sulfit bildende Stamm ist also in der Lage, Sulfat intrazellulär zu speichern, während Normalstämme das aufgenommene Sulfat sofort weiter umsetzen (MAW, 1963b; MAW, 1965). Entgegen anderslautenden Vermutungen (BIDAN und SALGUES, 1981) ist der hohe Gesamt-Schwefelgehalt von sulfitbildenden Weinhefen nicht auf eine Sulfit-, sondern auf eine Sulfatanreicherung in den Zellen zurückzuführen. Ähnlich hohe intrazelluläre Sulfatkonzentrationen (25 - 40 mM) sind auch in Mutanten von Penicillium chrysogenum (SEGEL und JOHNSON, 1961) und Aspergillus nidulans (BRADFIELD et al., 1970) gemessen worden.

Die Untersuchungen zur Bestimmung der intrazellulären Schwefelverbindungen liefern eine Erklärung für die von DOTT (1977) durchgeführten Messungen des Gesamtschwefelgehaltes der hier untersuchten Hefen. Die höheren Werte der Sulfitbildner im Vergleich zu den Normalstämmen sind zumindest teilweise auf den hohen Sulfatgehalt der sulfitbildenden Stämme zurückzuführen. Aber auch die Konzentration anderer Schwefelverbindungen ist im Vergleich zum Normalstamm erhöht. Dies gilt sowohl für APS und PAPS, als auch für die elektrophoretisch nicht getrennten Substanzen (Abb. 36 und Tab. 13). Bei diesen handelt es sich vermutlich um die schwefelhaltigen Aminosäuren und ihre Derivate, Glutathion, Sulfatester oder "gebundenes" Sulfit (Tab. 6; YAMAMOTO und SEGEL, 1966; MACRIS, 1972; HARTNELL und SPEDDING, 1979).

Hohe intrazelluläre Sulfat-Konzentrationen treten in der Regel in Mutanten auf, die nicht in der Lage sind, Sulfat zu assimilieren, da ihnen beispielsweise das Enzym ATP-Sulfurylase fehlt (BRADFIELD et al., 1970; MARZLUF, 1974). Dies gilt jedoch nicht für den hier vorliegenden Fall. Die ersten Enzyme der Sulfat-Assimilation ATP-Sulfurylase, APS-Kinase und PAPS-Sulfotransferase (vgl. Abb. 2) wurden sowohl in den Sulfit bildenden als auch in den Normalstämmen nachgewiesen und charak-

terisiert (HEINZEL und TRÜPER, 1976; 1978; BAUMGARTEN, 1981). Die Enzyme der Sulfitbildner weisen gegenüber denjenigen der Normalstämme erhöhte Aktivität und größere Affinität zum Substrat auf. Die hohe intrazelluläre Sulfatkonzentration kann daher nicht durch veränderte Eigenschaften der an der Assimilation beteiligten Enzyme bedingt sein. Es muß sich vielmehr um eine Fehlregulation des Sulfat-Transportsystems selbst handeln. Hinweise darauf ergaben sich bei den ersten Untersuchungen zur Sulfataufnahme dieser Hefen (DOTT et al., 1977). Die Autoren konnten zeigen, daß die Transportsysteme der Sulfitbildner eine erhöhte Aktivität gegenüber den Normalstämmen besitzen. Insbesondere fehlt die bei den Normalstämmen beobachtete Substrathemmung bei hohen Sulfatkonzentrationen.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse ergänzen die Untersuchungen über die Sulfitbildung bei Weinhefen. Sie stützen die Beobachtungen von DOTT und Mitarbeitern (1977), die die Sulfitbildung unter anderem auf eine Fehlregulation des Sulfat-Transportsystems der Sulfit bildenden Hefen zurückführen konnten.

In Abb. 37 sind die in der vorliegenden Arbeit überprüften Möglichkeiten des Sulfit-Transports zusammengestellt. Die ersten Untersuchungen machten deutlich, daß es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen passiven Vorgang handelt, der in Richtung des Konzentrationsgefälles verläuft.

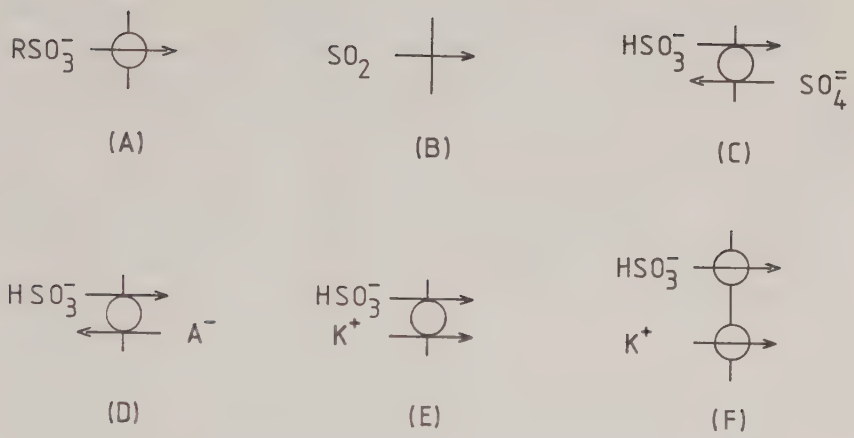

Abb. 37: Experimentell überprüfte Möglichkeiten des Sulfit-Efflux bei sulfitbildenden Weinhefen der Gattung Saccharomyces
$R\text{-}SO_3^-$ "gebundenes" Sulfit; A^- Anion.

Sulfit liegt intrazellulär und extrazellulär überwiegend in gebundener Form vor, wird aber nicht in dieser Form transportiert (Abb. 37A).

Ein Sulfit-Efflux durch einfache Diffusion als SO_2 (Abb. 37B) konnte aufgrund der experimentellen Daten ausgeschlossen werden. Zwar bestätigen die vorliegenden Versuche die Befunde von MACRIS und MARKAKIS (1974), daß SO_2 die Hefecytoplasmamembran mit großer Schnelligkeit zu durchqueren vermag, jedoch ist der Sulfit-Efflux auf den Transport als HSO_3^- - Anion zurückzuführen.

Die Hypothese, daß der Efflux über das Sulfat-Transportsystem vermittelt wird (Abb. 37C), läßt sich experimentell nicht widerlegen, wenn auch die Versuchsergebnisse eher gegen sie

sprechen. Suspendiert man mit Sulfat beladene Zellen in schwefelfreiem Medium, findet nur ein Sulfit-Efflux statt, obwohl ausreichend hohe intrazelluläre Sulfatkonzentrationen vorhanden sind. Das spricht eher für zwei verschiedene als für ein und denselben Träger, der eine um zwei Zehnerpotenzen höhere Affinität für Sulfit haben müßte. Ein weiteres Argument gegen einen Sulfit-Efflux durch das Sulfat-Transportsystem ist die Tatsache, daß ein ungehinderter Efflux auch bei Inkubation mit Methionin stattfindet, obwohl unter diesen Bedingungen der Sulfat-Träger reprimiert ist. Auch die starke Hemmung der Sulfataufnahme durch das Bisulfit-Molekül macht einen Efflux über dieses System eher unwahrscheinlich.

Ob der Sulfit-Efflux über ein anderes Anionen-Transportsystem (Abb. 37D) erfolgt, kann aufgrund der gegebenen Verhältnisse nicht geklärt werden. Ein dafür charakteristisches Phänomen, der Transmembraneffekt, der unter bestimmten Bedingungen im Falle eines gemeinsamen Trägers für zwei Substrate gefordert wird, läßt sich nicht nachweisen. Das bedeutet, daß entweder tatsächlich kein Anionenaustausch stattfindet, oder daß er nur aufgrund der geringen intrazellulären Sulfit-Konzentration nicht nachweisbar ist. Der ungehinderte Efflux in Wasser, also ohne externes Anion, spricht gegen einen Anionenaustausch.
Für einen Sulfit-Efflux über ein Anionen-Transportsystem stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Mikroorganismen besitzen zusätzlich zum Sulfat-Träger noch weitere Systeme für die Aufnahme der Anionen der Gruppe VI des Periodensystems (TWEEDIE und SEGEL, 1970; BROWN und SHRIFT, 1982). Eine andere Möglichkeit wäre das von BRETON und SURDIN-KERJAN (1977) bei Hefen nachgewiesene Sulfat-Transportsystem II. Auch ein Efflux über den Phosphat-Träger wäre denkbar, der im Falle der Hefen das monovalente Phosphat-Ion ($H_2PO_4^-$) transportiert (GOODMAN und ROTHSTEIN, 1957; COCKBURN et al., 1975; BORST-PAUWELS und PETERS, 1977; ROOMANS et al., 1979). Auf den Austausch-Transport von Sulfat, Sulfit und Phosphat bei Mitochondrien, Chloroplasten und Erythrocyten wurde bereits hingewiesen.

Der Transport von Sulfit als HSO_3^--Anion konnte eindeutig nachgewiesen werden.
Dabei handelt es sich jedoch nicht um einen Kalium/Sulfit-Symport (Abb. 37E), sondern um den in Abb. 37F dargestellten Fall zweier verschiedener Transportsysteme für Kalium und Sulfit.

5. Zusammenfassung

1) Die Sulfat-Aufnahme von Weinhefen der Gattung Saccharomyces wurde charakterisiert um zu überprüfen, ob Sulfit über den Sulfat-Träger transportiert wird. Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit, die Kinetik der Aufnahme und der Einfluß der Inkubationsdauer ohne externe Schwefelquelle wurden untersucht.

2) Das Sulfat-Analogon Sulfit bewirkte eine deutliche Hemmung des Sulfat-Transports, sowohl bei Präinkubation mit Sulfit als auch bei gleichzeitiger Zugabe beider Substrate. Beim Vergleich zwischen Normalstamm und Sulfitbildner erwies sich der Normalstamm bei niedrigen (< 1 mM) Sulfitkonzentrationen empfindlicher gegenüber Sulfit als der sulfitbildende Stamm.

3) Die kinetische Analyse ergab eine nicht-kompetitive Hemmung durch Sulfit. Sie konnte auf das HSO_3^--Anion zurückgeführt werden.

4) Die Frage nach einem gemeinsamen Träger für Sulfat und Sulfit ließ sich durch die Untersuchungen zur Hemmung des Sulfat-Transportsystems durch Sulfit nicht klären, da sich Transport-bedingte Phänomene und unspezifische chemische Reaktionen des Sulfitmoleküls überlagerten. Die Ergebnisse der Untersuchungen des Sulfit-Transports aus der Zelle sprechen eher gegen die Möglichkeit des Sulfit-Efflux über den Sulfat-Träger.

5) Das Transportsystem für den Sulfit-Efflux der sulfitproduzierenden Weinhefen wurde beschrieben, nachdem eine Methode zur Messung des Efflux entwickelt und optimiert worden war.

6) Ein Vorbeladen der Zellen mit Sulfit war nicht möglich. Somit mußte immer eine Wechselwirkung zwischen Transport und Schwefel- oder Energiestoffwechsel in Erwägung gezogen werden.

7) Der Einsatz von Transportinhibitoren machte deutlich, daß es sich beim Sulfit-Efflux um einen passiven Transport handelt, der nicht an den elektrochemischen Protonen-Gradienten der Membran gekoppelt ist.

8) Eine geeignete Methode für die Permeabilisierung der Zellen zur Bestimmung der intrazellulären Sulfit-Konzentration wurde entwickelt.

9) Der Stoffwechsel ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Sulfit-Efflux, da die intrazelluläre Sulfit-Konzentration sehr gering (0.6 mM) ist. Aus diesem Grund kann nicht entschieden werden, ob bestimmte Transport-parameter, wie z.B. der Transmembraneffekt, tatsächlich nicht auftreten oder nur nicht nachweisbar sind.

10) Ein Vergleich der intrazellulären Schwefelverbindungen bei einem Normalstamm und einem Sulfitbildner ergab deutliche Unterschiede. Besonders auffällig ist die Diskrepanz in bezug auf die intrazelluläre Sulfatkonzentration. Im Falle des Normalstammes läßt sich weder durch Dünnschichtchroma-tographie noch durch Hochspannungselektrophorese Sulfat nachweisen. Im Gegensatz dazu verfügt der sulfitbildende Stamm über ausreichende Mengen intrazellulären Sulfats (26.8 mM), um einen 24-stündigen Efflux ohne externe Schwefelquelle zu ermöglichen.

11) Extrazelluläres Sulfit vermindert den Sulfit-Efflux. Der Hemmeffekt läßt sich auf das SO_2-Molekül zurückführen.

12) Einfache Diffusion als SO_2 ist nicht für den Sulfit-Transport der sulfitproduzierenden Hefen verantwortlich. Aufgrund der experimentellen Daten ist ein elektrogener Transport als HSO_3^--Anion wahrscheinlich, der durch Kalium-Ionen elektrisch kompensiert wird. Ein Kalium/Sulfit-Symport konnte ausgeschlossen werden.

6. Literaturverzeichnis

ANACLETO, J. and UDEN, N. van (1982). Kinetics and activation energetics of death in Saccharomyces cerevisiae induced by sulfur dioxide. Biotechnology and Bioengineering, XXIV, 2477 - 2486

ANDREASEN, A.A. and STIER, T.J.B.(1953). Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae. J. Cell. Comparat. Physiol. 1, 23 - 26

BABICH, H. and STOTZKY, G. (1974). Air pollution and microbial ecology. Crit. Rev. Environ. Control. 4, 353 - 421

BARNES, E.M.Jr. and ZIMNIAK, P. (1981). Transport of ammonium and methylammonium ions by Azotobacter vinelandii. J. Bacteriol. 146 (2), 512 - 516

BARNETT, J.A., PAYNE, R.W. and YARROW, D. (1983). Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press.

BASAŘOVÁ, G. and MIKYSKA, A. (1982). Bedeutung und Ursprung des Schwefeldioxids in Bier. Kvasný prumysl (tschech.) 28(9), 218 - 220

BAUMGARTEN, F. (1981). Aspekte der assimilatorischen Sulfatreduktion und Sulfitresistenz bei Weinhefen mit und ohne Sulfitproduktion. Dissertation, Universität Bonn

BECKER, J.M. and LICHSTEIN, H.C. (1972). Transport overshoot during biotin uptake by Saccharomyces cerevisiae. BBA 282, 409 - 420

BECKER, J.M. and NAIDER, F. (1977). Peptide transport in yeast: uptake of radioactive trimethionine in Saccharomyces cerevisiae. Arch. Biochem. Biophys. 178, 245 - 255

BEEZER, A.E., CHOWDHRY, B.Z., COSGROVE, R.F. and SHARMA, P.B. (1982). On the uptake of nystatin by Saccharomyces cerecisiae. 5. The release of amino acids. Microbios 34(136) , 71 - 87

BEGEMANN, H. (1983). Optimale Wirksamkeit von Nystatin bei schwach sauren pH-Werten. GIT-Suppl. 3 (5), 31 - 33

BEILKE, S. and GRAVENHORST, G. (1974). Heterogenous SO_2 oxidation in the droplet phase. Atmos. Environ. 12, 231 - 239

BEUTLER, H.-O. und SCHÜTTE, J. (1983). Eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Sulfit in Lebensmitteln. Dt. Lebensmittel-Rundschau 10, 323 - 330

BEWLEY, R.J.F. and PARKINSON, D. (1984). Effects of sulphur dioxide pollution on forest soil microorganisms. Can. J. Microbiol. 30, 179 - 185

BEWLEY, R.J.F. and PARKINSON, D. (1985). Bacterial and fungal activity in sulphur dioxide polluted soils. Can. J. Microbiol. 31, 13 - 15

BIDAN, P. and SALGUES, M. (1981). Der Schwefelstoffwechsel der Hefe. 6. Int. Önologisches Symposium, 28.-30.04.81, Mainz; LEMPERLE, E. und FRANK, J. (eds.), Eigenverlag der internationalen Interessengemeinschaft für moderne Kellertechnik und Betriebsführung, Breisach

BONISH, P. and ESCHENBRUCH, R. (1976). Sulphite reductase and ATP sulfurylase in low and high sulfite forming wine yeasts. Arch. Microbiol. 109, 85 - 88

BOOGERD, F.C., VAN VERSEVELD, H.W. and STOUTHAMER, A.H. (1983). Dissimilatory nitrate uptake in Paracoccus denitrificans via a $\Delta \tilde{\mu}_{H^+}$ - dependant system and a nitrate-nitrite antiport system. BBA 723 (3), 415 - 427

BOOTH, J.R. and HAMILTON, W.A. (1980). Quantitative analysis of proton linked transport systems. β-Galactoside exit in Escherichia coli. Biochem. J. 188 (2), 467 - 473

BORON, W.F. (1983). Transport of H^+ and of ionic weak acids and bases. J. Membrane Biol. 72 (1 - 2), 1 - 16

BORST-PAUWELS, G.W.F.H. (1981). Ion transport in yeast. BBA 650, 88 - 127

BORST-PAUWELS, G.W.F.H. and PETERS, P.H.J. (1977). Effect of the medium pH and the cell pH upon the kinetical parameters of phosphate uptake by yeast. BBA 466, 488 - 495

BOSUND, J. (1962). The action of benzoic and salicylic acid on the metabolism of microorganisms. Adv. Food Research 11, 331 - 353

BOWMAN, B.J., MAINZER, S.E., ALLEN, K.E. and SLAYMAN, C.W. (1978). Effects of inhibitors on the plasma membrane and mitochondrial ATPases of Neurospora crassa. BBA 512, 13 - 28

BRADFIELD, G., SOMERFIELD, P, MEYN, T., HOLBY, M., BABCOCK, D., BRADLEY, D. and SEGEL, J.H. (1970). Regulation of sulfate transport in filamentous fungi. Plant. Physiol. 46, 720 - 727

BRAZY, P.C. and DENNIS, V.W. (1981). Sulfate transport in rabbit proximal convoluted tubules: presence of anion exchange. Amer. J. Physiol. 241 (3), F 300 - 306

BRETON, A. and SURDIN-KERJAN, Y. (1977). Sulfate uptake in Saccharomyces cerevisiae: biochemical and genetic study. J. Bacteriol. 132, 224 - 232

BRIMBLECOMBE, P. and SPEDDING, D.J. (1974). The catalytic oxidation of micromolar aqueous sulfur dioxide. Atmos. Environ. 8, 937 - 945

VAN DEN BROEK, P.J.A. and VAN STEVENICK, J. (1983). The influence of uncouplers on proton-sugar symport in Saccharomyces fragilis. BBA 722 (1), 102 - 106

VAN DEN BROEK, P.J.A., HAASNOOT, C.J.P., VAN LEEUWEN, C.C.M. and VAN STEVENICK, J. (1982). The influence of uncouplers on facilitated diffusion of sorbose in Saccharomyces cerevisiae. BBA Biomembranes, 689 (3), 429 - 436

BROWN, T.A. and SHRIFT, A. (1980). Assimilation of selenate and selenite by Salmonella typhimurium. Can. J. Microbiol. 26, 671 - 675

BROWN, T.A. and SHRIFT, A. (1982). Selective assimilation of selenite by Escherichia coli. Can. J. Microbiol. 28 (3), 307 - 310

BURROUGHS, L.F. and SPARKS, A.H. (1964). The determination of the free sulfur dioxide content of ciders. The Analyst, the Journal of the Society for Analytical Chemistry 89, No 1054, 55 - 60

CANTOR, C.R. and SCHIMMEL, P.R. (1980). Conformational equilibria of polypeptides and proteins: the helix coil transition. in: Biophysical chemistry, part III: The behaviour of biological macromolecules; pp. 1041; W.H. Freeman and company, San Francisco

CARR, J.G., DAVIES, P.A. and SPARKS, A.H. (1976). The toxicity of sulfur dioxide towards certain lactic acid bacteria from fermented apple juice. J. Appl. Bacteriol. 40, 201 - 212

CHEREST, H., SURDIN-KERJAN, Y., ANTONIEWSKI, J. and DE ROBICHON-SZULMAJSTER, H. (1973). S-adenosyl-methionine-mediated repression of methionine biosynthetic enzymes in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 114, 928 - 933

CHICHESTER, D.F. and TANNER, Jr. F.W. (1972). Antimicrobial food additives. in: T.E. FURIA (ed.): Handbook of food additives, 2nd ed., CRC Press, Cleveland, pp 115 - 184

CIRILLO, V.P. (1968). Galactose transport in Saccharomyces cerevisiae. 1. Nonmetabolized sugars as substrates and inducers of the galactose transport system. J. Bacteriol. 95, 1727 - 1731

CIRILLO, V.P., HARSCH, M. and LAMPEN, J.O. (1964). Action of the polyene antibiotics filipin, nystatin and N-acetyl-candidin on the yeast cell membrane. J. Gen. Microbiol. 35, 249 - 259

COCKBURN, M., EARNSHAW, P. and EDDY, A.A. (1975). The stoichiometry of the absorption of protons, with phosphate and L-glutamate by yeasts of the genus Saccharomyces. Biochem. J. 146, 705 - 712

COHEN, H.J. and FRIDOVICH, I. (1971). Hepatic sulfite oxidase. Purification and properties. J. Biol. Chem. 246, 359 - 366

COHEN, H.J., DREW, R.T. and RAJAGOPALAN, K.V. (1973). Molecular basis of the biological function of molybdenum. The relationship between sulfite oxidase and the acute toxicity of bisulfite and SO_2. Proc. Nat. Acad. Sci. US 70, 3655 - 3659

COOPER, B.P. (1980). Der enzymatische Mechanismus der Sulfataktivierung bei Rhodospirillaceae. Dissertation, Universität Bonn

COOPER, T.G., McKELVEY, J. and SUMRADA, R. (1979). Oxalurate transport in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 139 (3), 917 - 923

CRABEEL, M. and GRENSON, M. (1970). Regulation of histidine uptake by specific feedback inhibition of two histidine permeases in Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem. 14, 197 - 204

CRESSWELL, R.C. and SYRETT, P.J. (1982). The uptake of nitrate by the diatom Phaeodactylum: interactions between nitrite and nitrate. J. Exp. Botany 33 (137), 1111 - 1121

CROCOMO, O.J. and MENARD, L.N. (1962). Utilization of inorganic sulphate labelled with sulphur-35 by Torulopsis utilis. Nature 193, 502

CROMPTON, M., PALMIERI,F., CAPANO, M. and QUAGLIARIELLO, E. (1974). The transport of sulphate and sulphite in rat liver mitochondria. Biochem. J. 142, 127 - 137

CUHEL, R.L., TAYLOR, C.D. and JANNASCH, H.W. (1981). Assimilatory sulfur metabolism in marine microorganisms: characteristics and regulation of sulfate transport in Pseudomonas halodurans and Alteromonas luteoviolaceus, J. Bacteriol. 147 (2), 340 - 349

CUPPOLETTI, J. and SEGEL, J.H. (1974). Transinhibition kinetics of the sulfate transport system of Penicillium notatum. Analysis based on an iso uni uni velocity equation. J. Membrane Biol. 17, 239 - 253

CUPPOLETTI, J. and SEGEL, J.H. (1975). Kinetics of sulfate transport by Penicillium notatum. Interactions of sulfate, protons, and calcium. Biochemistry 14 (21), 4712 - 4718

DEANE, E.M. and O'BRIEN, R.W. (1975). Sulphate uptake and metabolism in the chrysomonad Monochrysis lutheri. Arch. Microbiol. 105, 295 - 301

DELHEZ, J., DUFOUR, J.P., THINES, D. and GOFFEAU, A. (1977). Comparison of the properties of plasma membrane-bound and mitochondria-bound ATPases in the yeast Schizosaccharomyces pombe. Eur. J. Biochem. 79, 319 - 328

DITTRICH, H.H. (1976). Spontangärung oder Reingärung? Ergebnisse, Konsequenzen, neue Wege. Die Weinwirtschaft 112,961 - 965

DITTRICH, H.H. (1977). Mikrobiologie des Weines. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart

DITTRICH, H.H. (1982). Senkung des SO_2-Bedarfs durch mikrobiologische Maßnahmen. Die Weinwirtschaft 118 Nr. 34, 920 - 921

DITTRICH, H.H. and STAUDENMAYER, T. (1970). Über die Zusammenhänge zwischen der Sulfitbildung und der Schwefelwasserstoff-Bildung bei Saccharomyces cerevisiae. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskrankh. Hyg., 2. Naturw. Abt. 124, 113 - 118

DITTRICH, H.H., SPONHOLZ, W.R. und GÖBEL, H.G. (1975). Vergleichende Untersuchungen von Mosten und Weinen aus gesunden und aus Botrytis-infizierten Traubenbeeren. Vitis 13, 336 - 347

DITTRICH, H.H., SPONHOLZ, W.R., WÜNSCH, B. und WIPFLER, M. (1980). Zur Veränderung des Weines durch den bakteriellen Säureabbau. Wein-Wiss. 35, 421 - 429

DODGSON, K.S. (1961). Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. Biochem. J. 78, 312 - 319

DORANGE, J.-L. and DUPUY, P. (1972). Mise en evidence d'une action mutagene du sulfite de sodium sure la levure. C.R. Acad. Sci. Paris Ser. D. 274, 2798 - 2800

DOTT, W. (1977). Enzymatische und regulatorische Untersuchungen der assimilatorischen Sulfatreduktion von Weinhefen der Gattung Saccharomyces im Hinblick auf eine erhöhte Sulfitproduktion während der Gärung. Dissertation, Universität Bonn

DOTT, W. and TRÜPER, H.G. (1976). Sulfite formation by wine yeasts III. Properties of sulfite reductase. Arch. Mikrobiol. 108, 99 - 104

DOTT, W. and TRÜPER, H.G. (1978a). Über die Notwendigkeit standardisierter Bedingungen zur Charakterisierung sulfitbildender Hefen. 2. Vergleich zwischen drei schwach und zwei sehr stark sulfitbildenden Hefestämmen der Arten Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus und S. bayanus. Wein-Wiss. 33, 277 - 288

DOTT, W. and TRÜPER, H.G. (1978b). Sulfite formation by wine yeasts VI. Regulation of biosynthesis of NADPH-and BV-dependant sulfite reductases. Arch. Microbiol. 118, 249 - 251

DOTT, W. and TRÜPER, H.G. (1979). Sulfite formation by wine yeasts VII. Regulation of the enzymatic steps between sulfide and sulfur-containing amino-acids. Arch. Microbiol. 121, 251 - 253

DOTT, W., HEINZEL, M. and TRÜPER, H.G. (1976). Sulfite formation by wine yeasts I. Relationships between growth, fermentation and sulfite formation. Arch. Microbiol. 107, 289 - 292

DOTT, W., HEINZEL, M. and TRÜPER, H.G. (1977). Sulfite formation by wine yeasts IV. Active uptake of sulfate by "low" and "high" sulfite producing wine yeasts. Arch. Microbiol. 112, 283 - 285

DREYFUSS, J. (1964). Characterization of a sulfate- and thiosulfate-transporting system in Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem. 239, No 7, 2292 - 2297

DREYFUSS, J. and PARDEE, A.B. (1966). Regulation of sulfate transport in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 91, 2275 - 2280

DUBOIS, E. and GRENSON, M. (1979). Methylamine/ammonia uptake systems in Saccharomyces cerevisiae: multiplicity and regulation. Mol. Gen. Genet. 175, 67 - 76

DUFOUR, J.P., BOUTRY, M. and GOFFEAU, A. (1980). Plasma membrane ATPase of yeast. Comparative inhibition studies of the purified and membrane-bound enzymes. J. Biol. Chem. 255, 5735 - 5741

EDDY, A.A. (1982). Mechanisms of solute transport in selected eukaryotic microorganisms. Advances in Microbial Physiology 23, 1 - 78

EIGEN, M., KUSTIN, K. and MAASS, G. (1961). Die Geschwindigkeit der Hydration von SO_2 in wässriger Lösung. Z. Phys.Chem. 30, 130 - 133

EILAM, Y. (1982a). Studies on calcium efflux in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Microbios 35, 99 - 110

EILAM, Y. (1982b). Studies on the nature of the primary lesion induced by nystatin in the cell-membranes of Saccharomyces cerevisiae. Microbios Letters 21, 79 - 84

EL-WAKIL, A.M., SOLIMAN, M.S. and FARAC, A.B. (1983). Quantum chemical interpretation of the photoinitiated autooxidation of sulfite catalysed by ferric ions. Zeitschrift f. Naturforschung 38(7), 858 - 860

ESCHENBRUCH, R. (1972a). Der Einfluß von Methionin und Cystein auf die SO_2-Bildung einiger Stämme von Saccharomyces cerevisiae bei der Vergärung von Traubenmost. VITIS 11, 53 - 57

ESCHENBRUCH, R. (1972b). Sulphate uptake and sulphite formation related to the methionine and/or cysteine content of grape must during the fermentation by strains of Saccharomyces cerevisiae. VITIS 11, 222 - 227

ESCHENBRUCH, R. (1974). Sulfite and sulfide formation during wine-making. A review. Amer. J. Enol. Viticult. 25, No 3, 157 - 161

ESCHENBRUCH, R., CRESSWELL, K.J., FISHER, B.M. and THORNTON, J. (1982). Selective hybridisation of pure culture wine yeasts. I. Elimination of undesirable wine-making properties. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechn. 14 (3), 155 - 158

ESCHENBRUCH, R., HAASBROCK, F.J. and de VILLIERS, J.F. (1973). On the metabolism of sulphate and sulphite during the fermentation of grape must by Saccharomyces cerevisiae. Arch. Mikrobiol. 93, 259 - 266

EVANS, C.T., SRAGG, A.H. and RATLEDGE, C. (1983). A comparative study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeasts. Eur. J. Biochem. 130 (1), 195 - 201

FELS, J.G. and CHELDELIN, V.H. (1949). Selenate inhibition studies. III The role of sulfate in selenate toxicity in yeast. Arch. Biochem. 22, 402 - 405

FISHBEIN, L. (1976). Atmospheric mutagens. I.Sulfur oxides and nitrogen oxides. Mut. Res. 32, 309 - 330

FLÜGGE, U.I. and HELDT, H.W. (1976). Identification of a protein involved in phosphate transport of chloroplasts. FEBS Lett. 68, 259 - 262

FORET, M., SCHMIDT, R. and REICHERT, V. (1978). On the mechanism of substrate binding to the purine-transport system of Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem. 82, 33-43

FREESE, E., SHEU, C.W. and GALLIERS, E. (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. Nature 241, 321 - 325

FUHRMANN, G.F., BOEHM, C. and THEUVENET, A.P.R. (1976). Sugar transport and potassium permeability in yeast plasma membrane vesicles. BBA 433, 583 - 596

GANCEDO, J.M. and GANCEDO, C. (1973). Concentrations of intermediary metabolites in yeast. Biochimie 55, 205 - 211

GOFFEAU, A. and SLAYMAN, C.W. (1981). The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. BBA 639, 197-223

GOLDING, R.M. (1960). Ultraviolet absorption studies of the bisulphite-pyrosulphite equilibrium. J. Chem. Soc. 741, p. 3711

GOODMAN, J. and ROTHSTEIN, A. (1957). The active transport of phosphate into the yeast cell. J. Gen. Physiol. 40 (6), 915 - 923

GRANT, W.M. (1947). Colorimetric determination of sulfur dioxide. Analyt. Chem. 19, 345 - 346

GUERRA, D., ROMANO, P. and ZAMBONELLI, C. (1981). Mutagenic effects of sulfur-dioxide on Saccharomyces cerevisiae diploid strains. Experientia 37 (7), 691 - 698

GUNN, R.B. (1980). Co- and counter-transport mechanisms in cell membranes. Ann. Rev. Physiol. 42, 249 - 260

HAAS, B. (1889). Über die Bildung von schwefliger Säure bei der Gärung. Ztschr. Nahrungsm.-Unters. u. Hyg., III, Nr. 12, 241 - 243

HAMILTON-MILLER, J.M.T. (1973). Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. Bacteriol. Rev. 37, 166-196

HAMMOND, S.M., LAMBERT, P.A. and KLIGER, B.N. (1974). The mode of action of polyene antibiotics; induced potassium leakage in Candida albicans. J. Gen. Microbiol., 81, 321 - 330

HAMPP, R. and ZIEGLER, I. (1977). Sulfate and sulfite translocation via the phosphate translocator of the inner envelope membrane of chloroplasts. Planta 137, 309 - 312

HAMPP, R., SPEDDING, D.J., ZIEGLER, I. and ZIEGLER, H. (1980). The efflux of inorganic sulphur from spinach chloroplasts. Zeitschr. f. Pflanzenphysiologie 99 (2), 113 - 119

HARTNELL, P.C. and SPEDDING, D.J. (1979). Uptake and metabolism of ^{35}S-sulphate by wine yeast. Vitis 18, 307 - 315

HAŠKOVEC, C. and KOTYK, A. (1973). Transport systems for acyclic polyols and monosaccharides in Torulopsis candida. Folia microbiol. 18, 118 - 124

HAUER, R. and HÖFER, M. (1978). Evidence for interactions between the energy-dependant transport of sugars and the membrane potential in the yeast Rhodotorula gracilis. J. Membrane Biol. 43, 335 - 349

HAUER, R., UHLEMANN, G., NEUMANN, J. and HÖFER, M. (1981). Proton pumps of the plasmalemma of the yeast Rhodotorula gracilis. Their coupling to fluxes of potassium and other ions. BBA 649, 680 - 690

HAYATSU, H. (1976). Bisulfite modification of nucleic acids and their constituents. Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 16, 75 - 124

VON HEDENSTRÖM, M. and HÖFER, M. (1979). The effect of nystatin on active transport in Rhodotorula glutinis (gracilis) is restricted to the plasma membrane. BAA 555, 169 - 174

HEINZEL, M. (1978). Regulation der Sulfat-Assimilation bei Weinhefen, Ursachen einer SO_2-Bildung. Dissertation, Universität Bonn

HEINZEL, M. and TRÜPER, H.G. (1976). Sulfite formation by wine yeasts II. Properties of ATP-sulfurylase. Arch. Microbiol. 107, 293 - 297

HEINZEL, M. and TRÜPER, H.G. (1978). Sulfite formation by wine yeasts V. Regulation of biosynthesis of ATP-and ADP-sulfurylase by sulfur- and selenium compounds. Arch. Microbiol. 118, 243 - 247

HEREDIA, C.F., SOLS, A. and DE LA FUENTE, G. (1968). Specificity of the constitutive hexose transport in yeast. Eur. J. Biochem. 5, 321 - 329

HÖFER, M. (1970).Mobile membrane carrier for monosaccharide transport in Rhodotorula gracilis. J. Membrane Biol. 3, 73 - 82

HÖFER, M. (1977). Transport durch biologische Membranen. Das Konzept der Trägerkatalyse. Verlag Chemie, Weinheim . New York

HÖFER, M., HAUER, R. and UHLEMANN, G.(1980). H^+-ATPase and H^+-Cotransport in Rhodotorula gracilis. in: SPANSWICH, R.M., LUCAS, W.J. and DAINTY, J. (eds.): Plant membrane transport: current conceptual issues, Elsevier/North Holland Biochemical Press.

HOFFEE, P., ENGLESBERG, E. and LAMY, F. (1964). The glucose permease-system in bacteria. BBA 79, 337 - 350

HORÁK, J. and ŘÍHOVÁ, L. (1982). L-proline transport in Saccharomyces cerevisiae. BBA Biomembranes 691(1), 144 - 150

HORÁK, J., ŘÍHOVÁ, L. and KOTYK, A. (1981). Energetization of sulfate transport in yeast. BBA 649(2), 436 - 440

HOSAKA, K. and YAMASHITA, S. (1980). Choline transport in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 143(1), 176 - 181

HUGHES, D.E., WIMPENNY, J.W.T. and LLOYD, D. (1971). The disintegration of micro-organisms. in: J.R. NORRIS and D.W. RIBBONS (eds.), Methods in microbiology, Vol. 5 B, Academic Press., London and New York

IGUCHI, A. (1958a). The separation of polythionates with anion-exchanger resins. Bull. Chem. Soc. Jap. 31, 597 - 600

IGUCHI, A. (1958b). The separation of sulfate, sulfite, thiosulfate and sulfide ions with anion-exchanger resins. Bull. Chem. Soc. Japan, 31, 600 - 605

INESON, P. and GRAY, T.R.G. (1980). Monitoring the effects of "acid rain" and sulphur dioxide upon soil micro-organisms. in: GOULD, G.W. and CORRY, J.E.L. (eds). Microbial growth and survival in extremes of environment. The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No. 15, Academic Press, London

INOUE, M. and HAYATSU, H. (1971). The interactions between bisulfite and amino acids. The formation of methionine sulfoxide from methionine in the presence of oxygen. Chem. Pharm. Bull. 19, 1286 - 1289

JEANJEAN, R. and BRODA, E. (1977). Dependance of sulphate uptake by Anacystis nidulans on energy, on osmotic shock and on sulphate starvation. Arch. Microbiol. 114, 19 - 23

JONES, L.H. and McLAREN, E. (1958). Infrared absorption spectra of SO_2 and CO_2 in aqueous solution. J. Chem. Phys. 28, 995

JUND, R., CHEVALLIER, M.R. and LACROUTE, F. (1977). Uracil transport in Saccharomyces cerevisiae. J. Membrane Biol. 36, 233 - 251

KAPLAN, D.M., LUCHTEL, D.L. and McJILTON, C.E. (1974). Chronic exposure to SO_2: possible effects at the cellular level. Environm. Lett. 7(4), 303 - 310

KAPLAN, D., McJILTON, C. and LUCHTEL, D. (1975). Bisulfite induced lipid oxidation. Arch. Environ. Health 30, 507 - 509

KEENAN, M.H.J., ROSE, A.H. and SILVERMAN, B.W. (1982). Effect of plasma-membrane phospholipid unsaturation on solute transport into Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol. 128 (11), 2547 - 2551

KIELHÖFER, E. und AUMANN, H. (1957). Die Bestimmung der gesamten und freien schwefligen Säure im Wein, auch in Gegenwart von Ascorbinsäure. Mitt. Klosterneuburg, Serie A, 7, 287 - 297

KLEINER, D. (1981). The transport of NH_3 and NH_4^+ across biological membranes. BBA 639 (1), 41 - 52

KLEINZELLER, A., KOTYK, A. and KOVAC, L. (1959). Utilization of inorganic sulfate by baker's yeast. Nature 183, 1402 - 1403

KLÖPPEL, R. und HÖFER, M. (1976). Transport und Umsatz von Polyalkoholen bei der Hefe Rhodotorula gracilis (glutinis). I. Konstitutiver Polyalkoholtransport. Arch. Microbiol. 107, 329 - 334

KLOPPER, W.J. (1973). Zum Schwefeldioxidgehalt des Bieres. Brauwissenschaft 26, 109 - 111

KNOTH, J., ISAACS, J.M. and NJUS, D. (1981). Amine transport in chromaffin granule ghosts, pH dependence implies cationic form is translocated. J. Biol. Chem. 256 (13), 6541 - 6546

KOBAYASHI, G.S. and MEDOFF, G. (1977). Antifungal agents: Recent developments. Ann. Rev. Microbiol. 31, 291 - 308

KÖCK, M. and SCHLEE, D. (1981). Effect of sulfite on adenine nucleotides of the green algae Trebouxia. Phytochemistry 20 (9), 2089 - 2093

KOMOR, E., SCHWAB, W.G.W. and TANNER, W. (1979). The effect of intracellular pH on the rate of hexose uptake in Chlorella. BBA 555, 524 - 530

KONINGS, W.N. and BOOTH, J.R. (1981). Do the stoichiometries of ion-linked transport systems vary. Trends in Biochemical Sciences 6 (10), 257 - 262

KOTYK, A. (1959). Uptake of inorganic sulphate by the yeast cell. Folia Microbiol. 4, 363 - 372

KOTYK, A. (1963). Intracellular pH of bakers yeast. Folia Microbiol. 8, 27 - 31

KOTYK, A. (1980). Transportsysteme der Hefezellmembran. Biol. Rdsch. 18, 359 - 365

KOTYK, A. und HÖFER, M. (1965). Uphill transport of sugars in the yeast Rhodotorula gracilis. BBA 102, 410 - 422

KOTYK, A. and SIGLER, K. (1981). Transmembrane movements of protons in simple eukaryotic cells. Studia biophysica 84 (1), 55 - 56

KOTYK, A., HORÁK, J. and KNOTKOVÁ, A. (1982a). Transport protein synthesis in non-growing yeast cells. BBA 698 (3), 243 - 251

KOTYK, A., PONEC, M. and ŘÍHOVÁ, L. (1971). Uptake of amino acids by actidione - treated yeast cells. I. Specifity of carriers. Folia microbiologica, 16, 432 - 444

KOTYK, A., STRUZINSKY, R. and SLAVÍK, J. (1982b). Electrochemical potential of protons and active transport in several yeast species. Studia biophysica 90, 17 - 18

KOVÁŘ, L. and POLIACHOVÁ, V. (1981). Membrane potential monitoring cyanine dyes uncouple respiration and induce respiration-deficient mutants in intact yeast cells. Biochemistry international 2 (5), 503 - 507

KOVÁČ, L. and VAREČKA, L. (1981). Membrane potentials in respiring and respiration-deficient yeasts monitored by a fluorescent dye. BBA 637 (2), 209 - 216

KUO, S.C., CHRISTENSEN, M.S. and CIRILLO, V.P. (1970). Galactose transport in Saccharomyces cerevisiae II. Characteristics of galactose uptake and exchange in galactokinaseless cells. J. Bacteriol. 103, 671 - 678

LAANE, C., KRONE, W., KONIGS, W., HAAKER, H. and VEEGER, C. (1980). Short-term effect of ammonium chloride on nitrogen fixation by Azotobacter vinelandii and by bacteroids of Rhizobium leguminosarum. Eur. J. Biochem. 103, 39 - 46

LANG, K. (1960). Die physiologischen Wirkungen von schwefliger Säure. Gutachten. Schriftenreihe des Bundes für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde, Heft 31, Hamburg - Berlin - Düsseldorf

LANGRIDGE-SMITH, J.E., SELLIN, J.H. and FIELD, M. (1983). Sulfate influx across the rabbit ileal brush border membrane: sodium and proton dependence, and substrate specifities. J. Membrane Biol. 72 (1 - 2), 131 - 139

LEGGET, J.E. and EPSTEIN, A. (1956). Kinetics of sulfate absorption by barley roots. Plant Physiol. 31, 222 - 226

LEICHTER, J. and JOSLYN, M.A. (1969). Kinetics of thiamine cleavage by sulfite. Biochem. J. 113, 611 - 615

LIKENS, G.E., WRIGHT, R.F., GALLOWAY, J.N. and BUTLER, T.J. (1979). Acid Rain. Scientific American 241 (4), 39-47

LINDAN, O. and WORK, E. (1951). The amino-acid composition of two yeasts used to produce massive dietetic liver necrosis in rats. Biochem. J. 48, 337 - 340

LINEWEAVER, H. and BURK, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. J. Amer. chem. Soc. 56, 658 - 666

LOSSON, R., JUND, R. and CHEVALLIER, M.R. (1978). Properties of three distinct pyrimidine transport systems in yeast. Evidence for distinct energy coupling. BBA 513, 296 - 300

LOWE, A.G. and LAMBERT, A. (1982). Chloride-bicarbonate exchange and related transport processes. BBA 694(4), 353 - 374

LUKASZKIEWICZ, J. and PIENIĄŻEK, N.J. (1972). Mutations increasing the specifity of the sulfate permease in Aspergillus nidulans. Bull.Acad.Pol.Sci. 20, 833 - 836

MacFARLANE, J.J. and SMITH, F.A. (1982). Uptake of methylamine by Ulva rigida: Transport of cations and diffusion of free base. J. Exp. Bot. 33 (133), 195 - 207

MACRIS, B.J. (1972). Transport and toxicity of SO_2 in the yeast Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus. Dissertation, Michigan State University.

MACRIS, B.J. and MARKAKIS, P. (1974). Transport and toxicity of sulphur dioxide in Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus. J. Sci. Fd. Agric. 25, 21 - 29

MALONEY, P.C. and WILSON, T.H. (1973). Quantitative aspects of active transport by the lactose transport system of Escherichia coli. BBA 330, 196 - 205

MALONEY, P.C., KASHKET, E.R. and WILSON, T.H. (1975). Methods for studying transport in bacteria. in: E.D. KORN (ed.), Methods in membrane biology, Bd. 5 Transport, 1- 49, Plenum Press, New York, London.

MARZLUF, G.A. (1970a). Genetic and metabolic controls for sulfate metabolism in Neurospora crassa: isolation and study of chromate-resistant and sulfate transport-negative mutants. J. Bacteriol. 102, 716 - 721

MARZLUF, G.A. (1970b). Genetic and biochemical studies of distinct sulfate permease species in developmental stages of Neurospora crassa. Arch. Biochem. Biophys. 138, 254 - 263

MARZLUF, G.A. (1974). Uptake and efflux of sulfate in Neurospora crassa. BBA 339, 374 - 381

MARZLUF, G.A. (1975). Genetic and developmental regulation of distinct sulfate permease species in Neurospora crassa. in: MARKERT, C.L. (ed.), Isoenzymes 3. Developmental biology, S. 239 - 252, Acad. Press., N.Y., San Francisco, London.

MAUGENET, J., LIPIEC, M.-H., DALMEYDA, M.L. (1972). Détermination de la méthionine dans les levures par hydrolyse alcaline et colorimétrie spécifique. Am. Technol. Agric. 21, 73 - 79

MAW, G.A. (1963a). The uptake of inorganic sulphate by brewer's yeast. Folia Microbiol. 8, 325 - 332

MAW, G.A. (1963b). Sulphur utilization by yeast. Pure Appl. Chem. 7, 655 - 668

MAW, G.A. (1965). The role of sulphur in yeast growth and brewing. Wallerst. Lab. Commun. 28, 49 - 70

McCREADY, R.G.L. and DIN, G.A. (1974). Active Sulfate Transport in Saccharomyces cerevisiae. FEBS Letters, Vol. 28, No. 3 , 361 - 363

McDONOUGH, J.P., JAYNES, P.K. and MAHLER, H.R. (1980). Partial characterization of the plasma membrane ATPase from a rho^{o} petite strain of Saccharomyces cerevisiae. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 12, Nos. 3/4, 249-264

McKILLEN, M.M. and SPENCER, B. (1970). Molybdate toxicity in Salmonella typhimurium. Biochem. J., 118, 27p

McLAUGHLIN, S.G.A. and DILGER, J.P. (1980). Transport of protons across membranes by weak acids. Physiological Reviews, 60(3), 825 - 863

MINÁRIK, E. und NAVARA, A. (1973). Der Einfluß von Methionin und Cystein auf die Sulfataufnahme und Sulfitbildung durch einige Saccharomyces-Arten. Biológia (Bratislava) 28, 955 - 960

MINÁRIK, E. and NAVARA, A. (1974). Effect of sulphate and sulfur amino acid levels on sulphite and sulfide formation by wine yeasts. Ann. Micr. 24, 21 - 36

MISRA, P.C. and HÖFER, M. (1975). An energy-linked proton-extrusion across the cell membrane Rhodotorula gracilis. FEBS Letters 52(1), 95 - 99

MITCHELL, S.C. and WARING, R.H. (1978). Detection of inorganic sulphate and other anions on paper and thin-layer chromatograms. J. Chromatography 166, 341 - 343

MOURIOUX, G. and DOUCE, R. (1979). Transport du sulfate à travers la double membrane limitante, ou enveloppe, des chloroplasts d'épinard. Biochimie 61, 1283 - 1292

NARZISS, L. (1982). SO_2-Entwicklung bei der Gärung. Abhängigkeiten von technologischen Faktoren. Brauwelt 122(7), 254 - 255

NARZISS, L., REICHENEDER, E. und NOTHAFT, H. (1982). Über den Schwefeldioxidgehalt des Bieres. Brauwelt 122(15), 627 - 636

NEAME, K.D. and RICHARDS, T.G. (1972). Elementary kinetics of membrane carrier transport. Blackwell Scientific Publications, Oxford

NIEMITZ, C., HAUER, R. and HÖFER, M. (1981). Active transport of charged substrates by a proton/sugar co-transport. Biochem. J. 194, 433 - 441

NISBET, T.M. and PAYNE, J.W. (1979). Peptide uptake in Saccharomyces cerevisiae - characteristics of transport system shared by dipeptides and tripeptides. J. Gen. Microbiol. 115 (1), 127 - 133

NISHIMUNE, T., TOMITA, M., YOSHII, Z. and HAYASHI, R. (1981). Counterflow efflux of thiamin in Escherichia coli. BBA 649, 419 - 426

NOBEL, P.S. (1974). Introduction to biophysical plant physiology. Freeman and Company, San Francisco

OKOROKOV, L.A., LICHKO, L.P. and KULAEV, J.S. (1980). Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium and phosphate iones in Saccharomyces carlsbergensis cells. J. Bacteriol. 144(2), 661 - 665

OKOROKOV, L.A., LICHKO, L.P., KADOMTSEVA, V.M., KHOLODENKO, V.P., TITOVSKY, V.T. and KULAEV, S. (1977). Energy dependant transport of manganese into yeast cells and distribution of accumulated ions. Eur. J. Biochem. 75, 373 - 377

PALACIOS, J. and SERRANO, R. (1978). Proton permeability induced by polyene antibiotics. A plausible mechanism for their inhibition of maltose fermentation in yeast. FEBS Letters 91 (2), 198 - 201

PASSERA, C. and FERRARI,G. (1975). Sulphate uptake in two mutants of Chlorella vulgaris with high and low sulfur amino acid content. Physiol. Plant. 35, 318 - 321

PAUL, F. (1958). Die alkalimetrische Bestimmung der freien, gebundenen und gesamten schwefligen Säure mittels des Apparates von Lieb und Zacherl. Mitt. Klosterneuburg, Serie A, 8, 21 - 27

PERL, M., KEARNEY, E.B. and SINGER, T.D. (1976). Transport of Riboflavin into yeast cells. J. Biol. Chem. 251, 3221 - 3228

PETERING, D.H. and SHIH, N.T. (1975). Biochemistry of bisulfite-sulfur dioxide. Environm. Res. 2, 55 - 65

PFLEIDERER, G., JECKEL, D. and WIELAND, T. (1956). Action of sulfite on diphosphopyridine nucleotide hydrogenating enzymes. Biochem. Z. 328, 187 - 194

PFLEIDERER, G., STOCK, A., ÖTTING, F. and DIEMAIR, W. (1968). Beitrag zur Kenntnis des Schicksals der schwefligen Säure im tierischen Organismus. Photometrische Sulfitbestimmung mit 2,6 - Dichlorphenolindophenol. Fresenius' Z. Anal. Chem. 239, 225 - 233

POSTGATE, J.R. (1963). The examination of sulphur auxotrophs: a warning. J. Gen. Microbiol. 30, 481 - 484

RABE, R. und KREEB, K.H. (1980). Wirkungen von SO_2 auf die Enzymaktivität in Pflanzenblättern. Z. Pflanzenphysiol. 97, 215 - 226

RADLER, F. and SCHÜTZ, H. (1982). Glycerol production of various strains of Saccharomyces. Am. J. Enol. Vitic. 33, 36 - 40

REHM, H.J. und WITTMANN, H. (1963a). Beitrag zur Kenntnis der antimikrobiellen Wirkung der schwefligen Säure. I. Mitteilung: Übersicht über einflußnehmende Faktoren auf die antimikrobielle Wirkung der schwefligen Säure. Z. Lebensmitt. Untersuch. Forsch. 118, 413 - 429

REHM, H.J. und WITTMANN, H. (1963b). Beitrag zur Kenntnis der antimikrobiellen Wirkung der schwefligen Säure. II. Mitteilung: Die Wirkung der dissoziierten und undissoziierten Säure auf verschiedene Mikroorganismen. Z. Lebensmittl. Untersuch. Forsch. 120, 465 - 478

REHM, H.J., SENING, E., WITTMANN, H. und WALLHÖFER, P. (1964). Beitrag zur Kenntis der antimikrobiellen Wirkung der schwefligen Säure. III. Mitteilung: Aufhebung der antimikrobiellen Wirkung durch Bildung von Sulfonaten. Z. Lebensmitt. Untersuch. Forsch., 123, 425 - 432

REHM, H.J., WALLHÖFER, P. und KESKIN, H. (1965). Beitrag zur Kenntnis der antimikrobiellen Wirkung der schwefligen Säure. IV. Mitteilung: Dissoziation und antimikrobielle Wirkung einiger Sulfonate. Z. Lebensmitt. Untersuch. Forsch. 127, 72 - 85

RIEMERSMA, J.C. and ALSBACH, E.J.J. (1974). Proton translocation during anaerobic energy production in Saccharomyces cerevisiae . BBA 339, 274 - 284

ROBERTS, K.R. and MARZLUF, G.A. (1971). The specific interaction of chromate with the dual sulfate permease system of Neurospora crassa. Arch. Biochem. Biophys. 142, 651-659

ROMANO, P., ZAMBONELLI, C. and SOLI, M.G. (1976). Biosynthesis of sulphur amino acids in Saccharomyces cerevisiae. II. Analysis of sulphur dioxide-procuding strains. Arch. Microbiol. 108, 211 - 216

ROOMANS, G.M., BLASCO, F. and BORST-PAUWELS, G.W.F.H. (1977). Cotransport of phosphate and sodium by yeast. BBA 467, 65 - 71

ROOMANS, G.M., KUYPERS, G.A.J., THEUVENET, A.P.R. and BORST-PAUWELS, G.W.F.H. (1979). Kinetics of sulfate uptake by yeast. BBA 551, 197 - 206

ROST, K. and VENNER, H. (1965). Enzymatische Zellwandverdauung bei Hefen durch Schneckenenzym. Arch. Mikrobiol. 51, 122 - 129

ROTHSTEIN, A. (1974). Relationship of cation influxes and effluxes in yeast. J. Gen. Physiol. 64, 608 - 621

ROY, A.B. und TRUDINGER, P.A. (1970). The biochemistry of inorganic compounds of sulphur. Cambridge at the University Press

RYAN, J.P. and RYAN, H. (1972). The role of intrazellular pH in the regulation of cation exchange in yeast. Biochem. J. 128, 139 - 146

SARIS, N.-E.L. (1980). Sulphate transport by H^+-symport and by the dicarboxylate carrier in mitochondria. Biochem. J. 192 (3), 911 - 917

SCHIFF, J.A. and HODSON, R.C. (1973). The metabolism of sulfate. Ann. Rev. Plant Physiol. 24, 381 - 414

SCHIMZ, K.L. (1980). The effect of sulfite on the yeast Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol. 125, 89 - 95

SCHIMZ, K.-L. and HOLZER, H. (1977). In-vitro effects of sulfite on enzymes of eucaryotic organisms. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1274

SCHIMZ, K.-L. and HOLZER, H. (1979). Rapid decrease of ATP content in intact cells of Saccharomyces cerevisiae after incubation with low concentrations of sulfite. Arch. Microbiol. 121, 225 - 229

SCHLENK, F. and DE PALMA, R.E. (1957). The formation of S-adenosylmethionine in yeast. J. Biol. Chem. 229, 1037 - 1050

SCHLENK, F., DAINKO, J.L. and SVIHLA, G. (1970). The accumulation and intracellular distribution of biological sulfonium compounds in yeast. Arch. Biochem. Biophys. 140, 228 - 236

SCHMIDT, A., ABRAMS, W.R. and SCHIFF, J.A. (1974). Reduction of adenosine 5'-phosphosulfate to cysteine in extracts from Chlorella and mutants blocked for sulfate reduction. Europ. J. Biochem. 47, 423 - 434

SCHMIDT, K., JENSEN, L. und SCHLEGEL, H.G. (1963). Die Carotinoide der Thiorhodaceae. I. Okenon als Hauptcarotinoid von Chromatium okenii Perty. Arch. f. Mikrobiol. 46, 117 - 126

SCHOBINGER, U. (1981). Möglichkeiten und Grenzen der SO_2-Einsparung in der Weinbereitung. Weinwirtschaft 117 (12), 326 - 330

SCHROETER, L.C. (1966). Sulfur dioxide. Applications in foods, beverages, and pharmaceuticals. Pergamon Press, Oxford

SEGEL, I.H. and JOHNSON, M.J. (1961). Accumulation of intracellular inorganic sulfate by Penicillium chrysogenum. J. Bacteriol. 81, 91 - 106

SERRANO, R. (1977). Energy requirements for maltose transport in yeast. Eur. J. Biochem. 80, 97 - 102

SHAPIRO, R. (1977). Genetic effects of bisulfite (sulfur dioxide). Mutation Research 39, 149 - 176

SIGLER, K., KNOTKOVÁ, A. and KOTYK, A. (1981). Factors governing substrate-induced generation and extrusion of protons in the yeast Saccharomyces cerevisiae. BBA 643, 572 - 582

SIMON, A. and WALDEMANN, K. (1956). Aqueous disulfite (pyrosulfite) solutions and their behaviour in relation to concentration and degree of basidity. Z. anorg. allg. Chem. 281, 113

SLAVÍK, J. (1982). Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. FEBS Letters 140 (1), 22 - 26

SOLDATINI, G.F., ZIEGLER, I. and ZIEGLER, H. (1978). Sulphite: preferential sulphur source and modifier of CO_2 fixation in Chlorella vulgaris. Planta 143, 225 - 231

SPEDDING, D.J., ZIEGLER, I., HAMP, R. and ZIEGLER, H. (1980a). Effect of pH on the uptake of ^{35}S-sulfur from sulfate, sulfite and sulfide by isolated spinach chloroplasts. Z. Pflanzenphysiol. 96, 351 - 364

SPEDDING, D.J., ZIEGLER, I., HAMPP, R. and ZIEGLER, H. (1980b). Effect of pH on the uptake of ^{35}S-sulfur from sulfate, sulfite and sulfide by Chlorella vulgaris. Z. Pflanzenphysiologie 97, 205 - 214

STARK, G. (1978). Carrier-mediated ion transport across thin lipid membranes. in: G. GIEBISCH, D.C.TOSTESON, H.H. USSING (eds.), Membrane transport in biology. I. Concepts and models, S. 447 ff., Springer-Verlag, Berlin

SUOMALAINEN, H. and KERANEN, A.J.A. (1955). Determination of sulphur in yeast. Z. anal. Chem. 148, 81 - 85

TAUSSKY, H.H. und SHORR, E. (1953). A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. J. Biol. Chem. 202, 675 - 685

THALACKER, R. und IHRING, H.H. (1974). Gärungsschwefeldioxidgehalt von obergärigen Bieren. Mschr. Brauerei 27, 107 - 108

THALACKER, R. und KALTWASSER, J. (1981). Zur lebensmittelrechtlichen Beurteilung des Schwefeldioxidgehalts von Bier. Mschr. Brauerei 34, 115 - 118

THORNTON, R.J. (1982). Selective hybridisation of pure culture wine yeasts. II. Improvements of fermentation efficiency and inheritance of SO_2 tolerance. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotech. 14 (3), 159 - 164

TORRI, K. and BANDURSKI, R.S. (1967). Yeast sulfate-reducing system. III. An intermediate in the reduction of 3'-phosphoryl-5'-adenosinephosphosulfate to sulfite. BBA 136, 286 - 295

TRESSEL, R., HOLZER, M. and NEUMANN, L. (1975). Über die Bildung von Schwefeldioxid in Bier. Mschr. Brauerei 28, 45 - 48

TRUDINGER, P.A. (1964). Products of anaerobic metabolism of tetrathionate by Thiobacillus X. Aust. J. Biol. Sci. 17, 446 - 458

TSANG, M.L.-S. und SCHIFF, J.A. (1975). Studies of sulfate utilization by algae: 14. Distribution of adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate (PAPS) and adenosine-5'-phosphosulfate (APS) sulfotransferases in assimilatory sulfate reducers. Plant Sci. Lett. 4, 301 - 307

TSANG, M.L.-S. and SCHIFF, J.A. (1976). Sulfate-reducing pathway in Escherichia coli involving bound intermediates. J. Bacteriol. 125, 923 - 933

TWEEDIE, J.W. and SEGEL, I.H. (1970). Specifity of transport processes for sulfur, selenium and molybdenum anions by filamentous fungi. Biochem. Biophys. Acta, 196, 95-106

ULASZEWSKI, S., GRENSON, M. and GOFFEAU, A. (1983). Modified plasma-membrane ATPase in mutants of Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem. 130 (2), 235 - 239

VACATA, V., KOTYK, A. and SIGLER, K. (1981). Membrane potential in yeast cells measured by direct and indirect methods. BBA 643 (1), 265 - 268

VALLÉE, M. and JEANJEAN, R. (1968a). Le système de transport de SO_4 chez Chlorella pyrenoidosa et sa régulation. I. Étude cinétique de la perméation. BBA 150, 599 - 606

VALLÉE, M. and JEANJEAN, R. (1968b). Le système de transport de SO_4 chez Chlorella pyrenoidosa et sa régulation. II. Recherches sur la régulation de l'entrée. BBA 150, 607 - 617

VASILJEVA, E.A., FITIN, A.F. and VINOGRADOV, A.D. (1982). Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. Biochem. J. 202, 15 - 23

VERACHTERT, H., HEEREN, J. and SPAEPEN, M. (1980). Über die Bestimmung von Schwefeldioxid und dessen Konzentration in belgischen Bieren. Cerevisia 5 (1), 27 - 32

VOERKELIUS, G.-A. (1982). Schwefeldioxidgehalt des Bieres, Einfluß der Gär- und Lagerkellerarbeit. Brauwelt 122 (38), 1676 - 1682

VOGT, E. (1970). Handbuch der Kellerwirtschaft 3: Weinchemie und Weinanalyse. 3. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

VOGT, E., JAKOB, L., LEMPERLE, E. und WEISS, E. (1984). Der Wein. Bereitung, Behandlung, Untersuchung. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

DE WAARD, M.A. and NISTELROOY, J.G.M. (1980). An energy-dependant efflux mechanism for fenarimol in a wild-type strain and fenarimol-resistant mutants of Aspergillus nidulans. Pesticide Biochemistry and Physiology, 13, 255 - 266

WARNER, J.R., MORGAN, S.A. and SHULMAN, R.W. (1976). Kinetics of labelling of the S-adenosyl-methionine pool of Saccharomyces cerevisiae, J. Bacteriol. 125, 887 - 891

WASUNGU, K.M. and SIMARD, R.E. (1982). Growth characteristics of baker's yeast in ethanol. Biotechnology and Bioengineering XXIV, 1125 - 1134

WEAST, R.C. (1970). Dissociation constants of inorganic acids in aequous solutions. in: Handbook of chemistry and physics, 1970 - 1971. The Chemical Ruber Company, 51st Edition, p.D-121

WEDDING, R.T. and BLACK. M.K. (1960). Uptake and metabolism of sulfate by Chlorella. I. Sulfate accumulation and active sulfate. Plant Physiol. 35, 72 - 80

WEISS, R.L., KUKRA, J.R. and ADAMS, J. (1975). The relation between enzyme activity, cell geometry and fitness in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 794 - 798

WEST, P.W. and GAEKE, G.C. (1956). Fixation of sulfur dioxide as disulfitomercurate (II) and subsequent colorimetric estimation. Anal. Chem. 28, No 12, 1816 - 1819

WILSON, L.G. and BIERER, D. (1976). The formation of exchangeable sulfite from adenosine 3'-phosphate 5'-sulphato-phosphate in yeast. Biochem. J. 158, 255 - 270

WODZINSKI, R.S., LABEDA, D.P. and ALEXANDER, M. (1978). Effects of low concentrations of bisulphite-sulphite and nitrite on microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 35, 718 - 723

WOLOSIN, J.M. (1980). A procedure for membrane-protein reconstitution and the functional reconstitution of the anion transport system of the human erythrocyte membrane. Biochem. J. 189 (1), 35 - 44

WÜRDIG, G. (1982). Neuere Entwicklungen in der Weinbehandlung. Dtsch. Weinb. 37 (9), 370

WÜRDIG, G. und SCHLOTTER, H.A. (1970). SO_2-Bildung durch Sulfatreduktion während der Gärung. II. Beeinflussung durch das Substrat und die Gärungsbedingungen. Wein.-Wiss. 25, 283 - 297

WYSS, O. (1948). Microbial inhibition by food preservatives. Adv. Food Res. 1, 373 - 393

YAMAMOTO, L.A. and SEGEL, I.H. (1966). The inorganic sulfate transport system of Penicillium chrysogenum. Arch. Biochem. Biophys. 114, 523 - 538

ZAKHAROV, S.D., BRONNIKOV, G.E. and MALYAN, A.N. (1983). Effect of sulphite on the P_i - ATP exchange activity of chloroplast and mitochondrial H^+-ATPase proteoliposomes. Biochemistry International 6 (6), 805 - 811

ZANG, K. (1963). Schweflige Säure im ungeschwefelten Most? Dt. Weinzeitung 99, 214

ZENVIRTH, D. and KAPLAN, A. (1981). Uptake and efflux of inorganic carbon in Dunaliella salina. Planta 152(1), 8-12

ZIEGLER, I. (1975). The effect of SO_2 pollution on plant metabolism. Residue Rev. 56, 79 -105

ZIEGLER, I. and HAMPP, R. (1977). Control of $^{35}SO_4$ and $^{35}SO_3$ incorporation into spinach chloroplasts during photosynthetic CO_2 fixation. Planta 137, 303 - 307

Herrn Prof. Dr. H.G. Trüper möchte ich für die Überlassung des Themas, für die großzügige Unterstützung der vorliegenden Arbeit und sein Interesse an ihrem Fortgang herzlich danken.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Höfer, Botanisches Institut der Universität Bonn, bedanke ich mich für sein reges Interesse an der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt seinem ehemaligen Mitarbeiter, Herrn Dr. Dr. R. Hauer, Waldbröl, für die Hilfe bei der Kationenbestimmung, seine wertvollen Anregungen und die Bereitschaft zur Diskussion der Versuchsergebnisse.

Herrn Dr. A. Czichos und meinem Schwager Herrn Dr. M. Wolff danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie, insbesondere den Kollegen des Turmlabors, für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für ihre Unterstützung.

LEBENSLAUF

Name	Eva-Beate Jorzig, geb. Witzmann	
Geburtsdatum und -ort	01. 04. 1955, Jena/Thüringen	
Familienstand	verheiratet seit 1977 mit Rainer Jorzig	
Schulausbildung	1961 - 1965	Grundschule in Siegburg
	1965 - 1973	Neusprachliches Mädchen-Gymnasium der Stadt Siegburg
	5/73	Abitur
Hochschulausbildung	1973 - 1979	Biologiestudium an der Universität Bonn
	11/75	Vordiplom
	1978 - 1979	Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Universität Bonn unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H.G. Trüper; Thema der Arbeit: "Sulfitreduktion in Thiocapsa roseopersicina"
	12/79	Diplom im Fachbereich Biologie
	5/80	Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation, die durch ein Projekt der DFG gefördert wurde; Betreuung: Prof. Dr. H.G. Trüper
Berufsbezogene Tätigkeit	5/80 - 2/84	Wissenschaftliche Mitarbeiterin mit halber Stelle am vorgenannten Institut, zunächst angestellt bei der Universität Bonn, seit 1982 im Rahmen eines Forschungsprojekts der DFG